



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE BACTÉRIAS NO
AMBIENTE.**

**II. USO DE ANTICORPOS COMO SONDAS EM ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO
DESTES MICRORGANISMOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO E
PLANTA**

**CNPAB
Seropédica, RJ
Outubro/1997**



**TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE BACTÉRIAS NO
AMBIENTE.**

**II. USO DE ANTICORPOS COMO SONDAS EM ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO
DESTES MICRORGANISMOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO E
PLANTA**

V.M. Reis; F.L. Olivares e G.B. Cruz

**CNPAB
Seropédica, RJ
Outubro/1997**

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à
Embrapa-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021)682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Comitê de Publicações

Helvécio De-Polli(Presidente)
Johanna Döbereiner
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Norma Gouveia Rumjanek
Sebastião Manhães Souto
Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; CRUZ, G.B. **Técnicas imunológicas aplicadas à detecção de bactérias no ambiente. II. Uso de anticorpos como sondas em estudos de localização destes microrganismos presentes em amostras de solo e planta.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 19p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 34).

1. Imunologia. 2. Bactéria. 3. Anticorpo. 4. Planta. 5. Solo. I. Olivares, F.L., colab. II. Cruz, G.B., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 571.96

© Embrapa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	5
3. TÉCNICAS DE LOCALIZAÇÃO <i>IN SITU</i>.....	6
3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	6
3.1.1. <i>Imunofluorescência em bactérias isoladas</i>	7
3.1.2. <i>Imunofluorescência em amostras de plantas</i>	8
3.2. IMUNOUIRO	9
3.2.1. <i>Sistema de detecção</i>	9
3.2.2. <i>Preparação das amostras</i>	11
3.2.3. <i>Marcação com ouro</i>	13
4. PERSPECTIVAS DE USO.....	16
5. AGRADECIMENTOS.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE BACTÉRIAS NO AMBIENTE. II. USO DE ANTICORPOS COMO SONDAS EM ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO DESTES MICRORGANISMOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE SOLO E PLANTA

Reis, V.M.¹, Olivares, F.L.² e Cruz, G.B.³

1. INTRODUÇÃO

Visando dar continuidade a apresentação de técnicas imunológicas aplicadas no estudo de bactérias no ambiente foi feito este documento que pretende dar ênfase a várias metodologias relacionadas aos estudos de localização destes microrganismos em amostras de solo e planta. Dentro deste universo complexo devemos ter em mente que ocorre uma interação entre estes diferentes componentes (solo-planta-microrganismos) sendo influenciados pelas características intrínsecas de cada um, mais a ação de fatores abióticos (luz, temperatura, pH, etc). Nota-se que a maioria dos trabalhos descritos na literatura são baseados na região de interfase destes três componentes, a chamada rizosfera (Curl & Truelove, 1989). Recentemente, o interior das plantas vem tendo destaque dentro de um novo enfoque que é o de colonização por bactérias benéficas (Döbereiner et al., 1995). Estes microrganismos podem viver em perfeita harmonia com o vegetal, sem demonstrar nenhum sintoma visual de sua existência. São denominados microrganismos endófitos (Kloepper & Beauchamp, 1992). Nesta categoria estão incluídos: as bactérias (Döbereiner et al., 1995), os actinomicetos (Sardi et al., 1992; Baker & Mulin, 1994), fungos tanto os unicelulares (leveduras) como os pluricelulares (micorrizas arbusculares) (Fisher et al., 1992) entre outros. Os novos conceitos sobre a saúde de plantas estão relacionados com o equilíbrio entre a população dita benéfica, como por exemplo a das bactérias diazotróficas e os outros, ditos patógenos. Toda esta complexa interação só pode ser estudada, “in situ”, através do uso de instrumentos de amplificação de imagens, como os microscópios.

¹ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia(CNPAB), km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

² Bolsista de recém-doutor do CNPq-Embrapa(CNPAB).

³ Assistente de Pesquisa, Embrapa(CNPAB).

Existem diversos modelos de microscópios que podem chegar a aumentos de até 400.000 vezes e com poder de resolução de 0,5 nm sendo chamados de microscópios eletrônicos, são eles: o de transmissão, o de varredura e o mais recente denominado de confocal com scanning a laser (maiores detalhes a seguir). Dentro do campo da microscopia ótica, cujo aumento pode chegar a 1000 vezes com poder de resolução de 0,2 μm , temos as lupas (microscópios estereoscópicos), o microscópio ótico e suas variantes como a microscopia de campo claro, campo escuro, contraste de fase, fluorescência, interferência e polarização. Tais equipamentos são úteis em estudos ecológicos em vários ambientes. No caso especial deste documento serão abordadas técnicas imunológicas aplicáveis no reconhecimento de bactérias, especialmente as diazotróficas, presentes em amostras de plantas tanto interna como externamente e algumas aplicações em amostras de solo.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como toda técnica imunológica, o primeiro passo é sempre o de caracterização do anticorpo (marcador) que será usado como sonda. Este assunto foi tratado em detalhe por Reis et al.,(1997) onde cada etapa, desde a imunização até a identificação da molécula de reconhecimento está descrito.

Para se ter sucesso com trabalhos que envolvam estudos de localização, é necessário que se conheça o ambiente de estudo. Vamos citar, como exemplo, um gênero de bactérias típicas de rizosfera, o *Azospirillum* spp., que pode ser encontrado no solo ou penetrar nas raízes de plantas hospedeiras e se localizar até no xilema (Patriquin & Döbereiner, 1978; Schlöter et al., 1994). Entretanto, o nicho onde é encontrado em maior número é a região da rizosfera das plantas. Estudos de colonização de bactérias diazotróficas enfocam principalmente, os processos de reconhecimento planta-bactéria como a forma e o processo de adesão à superfície das plantas (Duguid et al., 1980) e ancoramento (Bashan et al., 1991), a competição com outras estirpes (Pinheiro, 1992), penetração nos tecidos mais internos como a epiderme (Levanony et al., 1989) e finalmente chegam a caracterizar a colonização de vasos condutores (Hurek et al., 1994). Para cada etapa do estudo, uma técnica mais específica deve ser utilizada para a melhor compreensão dos resultados alcançados.

Para se quantificar a população alvo num dado habitat também se pode utilizar métodos imunológicos. Estas técnicas foram descritas anteriormente por Reis (1997). A fase de

quantificação serve para se escolher a parte da planta onde se deseja estudar o processo com maiores detalhes. A premissa básica é que o sinal de detecção obtido pela amostra deve ser sempre maior que sinais não específicos (ruído de fundo). Quando se avalia as bactérias isoladamente, é possível se separar apenas uma célula alvo, mas isto não é mais verdade em amostras complexas onde há o aparecimento de tecido vegetal e de solo. Todos estes detalhes serão discutidos a seguir, como também as formas de se resolver os eventuais problemas advindos do uso destas técnicas.

3. TÉCNICAS DE LOCALIZAÇÃO *In Situ*

3.1. Imunofluorescência

Marcadores fluorescentes (fluorocromos) podem ser acoplados a proteínas específicas como anticorpos, enzimas e lectinas. São muito sensíveis a visualização e diferem quanto ao espectro de excitação e emissão. Também permitem a marcação direta na molécula do anticorpo primário (maiores detalhes ler Harlow & Lane, 1988) ou indireta, através de um segundo anticorpo que pode ser obtido comercialmente (ex: Amersham Life Sciences, Boehringer Mannheim ou Sigma Bio Sciences) . O fluorocromo mais comum é o isotiocianato de fluoresceína (FITC - fluorescein isothiocyanate) com comprimento de onda para absorção de 450-500 nm e comprimento de onda de emissão de 500-550 nm que é visualizado pela cor verde. Outros compostos estão disponíveis para uso em material de planta, como a rodamina, que emite luz vermelha bem como o Texas RedTM e o R- Phycoerythrin (PE), que emite uma cor vermelho-alaranjada (maiores detalhes nos catálogos de compra destes reagentes). Cada fluorocromo exige uma combinação específica de filtros de barreira e excitação. Maiores detalhes sobre a seleção adequada de filtros e fluorocromos podem ser obtidos em suplementos científicos editados pelas firmas Zeiss e Olympus. A grande vantagem do uso destes marcadores é que mesmo concentrações extremamente baixas de fluorocromos (ex. 10^{-18} g) podem ser detectadas através do microscópio de fluorescência.

Estes fluorocromos podem ser usados na quantificação do número de células de bactérias (ou outros microrganismos ou mesmo moléculas biológicas) presentes numa dada amostra. Entretanto, detectam células culturáveis ou não e a confirmação positiva de células vivas não pode ser feita diretamente, exigindo a aplicação de outras técnicas mais específicas, tais como a marcação com sondas de RNA (maiores detalhes ler Reis et al., 1997).

O maior problema do uso de imunofluorescência é a autofluorescência, principalmente em amostras de solo e planta. Para minimizar tais problemas Bohlool & Schimidt (1968) desenvolveram o uso de gelatina para cobrir as amostras. Esta gelatina é hidrolisada e aplicada diretamente ou em mistura com rodamina. O pré-tratamento das amostras de solo e planta com conjugado gelatina-rodamina, bloqueia as adsorções não específicas e age como um contra-corante (fundo laranja) para conjugados marcados com FITC (verde). O uso da gelatina foi especialmente desenvolvido para amostras de solo e oferece um controle excelente para a marcação não específica deste material.

Preparação da gelatina para amostras de solo (Bohlool & Schimidt, 1968): preparar uma solução aquosa de gelatina (2%), ajustar para pH 10-11 com NaOH (1 M) para promover a hidrólise e autoclavar por 10 min a 121° C e reajustar para o mesmo pH inicial.

Preparação da gelatina-rodamina: adicionar isotiocianato de rodamina (RhITC, Sigma) dissolvido num volume mínimo de acetona à gelatina para uma concentração final de 8 µg de corante para cada mg de gelatina. Agitar a mistura levemente por 12 horas para promover a conjugação e passar por uma coluna Sephadex (G 25) equilibrada com tampão fosfato salino (PBS, pH 7.2) até que nenhuma cor seja visualizada no eluente. O conjugado pode ser coletado e preservado a -20°C em pequenos volumes com adição de 1:10.000 de mertiolate.

Uso da gelatina-rodamina: Os espécimes são cobertos com o conjugado e em seguida, deixar secar a 60° C. Após esfriar, as amostras são marcadas com FITC.

Embora a técnica de imunofluorescência possa ser usada em amostras de solo, a detecção *in situ* é muito prejudicada pela adsorção não específica, baixa resolução do microscópio ótico em relação ao tamanho da célula bacteriana e ao baixo número populacional no solo.

3.1.1. Imunofluorescência em bactérias isoladas

Bactérias são crescidas em meio líquido (rico ou mínimo) durante 24-48 hs sob agitação.

1. Retirar uma alíquota de 200 µl e centrifugar por 5 min a 5000 rpm. Ressuspender em 100 µl de PBS. As suspensões de células são transferidas para microtubos previamente bloqueados com BSA (3%) em PBS.

2. Adicionar 50µl dos anti-soros primários e incubar a 37°C por 30 min. As suspensões são centrifugadas e ressuspendidas 2 vezes em PBS com BSA (0,5%).

3. Adicionar 10 µl do anticorpo secundário biotilado (diluído 1/300 em PBS com BSA a 0,5%) com 100µl da mesma solução, incubar a 37°C por 45 min e lavar 2 X em PBS com BSA (0,5%).

4. Adicionar 10 µl da estreptavidina marcado com FITC diluído 1:10 em PBS e incubar a 37°C por 20 min. A seguir, centrifugar e ressuspender o pellet em 100µl de PBS.

5. As suspensões são transferidas para lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina ou agarose 0,2% e observadas em microscópio de fluorescência.

3.1.2. Imunofluorescência em amostras de plantas

Na fase inicial de preparo das amostras de tecido vegetal, deve-se fazer uma avaliação do nível de autofluorescência da amostra. De acordo com o resultado, pode-se utilizar amostras de planta cobertas com gelatina ou agarose, desde que o nível de autofluorescência seja elevado como também pode ser aplicado o método descrito por Bohlool & Schimidt, (1968).

1. Segmentos pequenos de raiz (3 cm) são bloqueados com BSA (3%) em PBS por 30 min.

2. A seguir são incubados com o anticorpo primário diluído 100 vezes em 50 µl de PBS + BSA (0,5%) por 30 min. Lavar 3X em PBS + BSA a 0,5% (solução de lavagem).

3. Adicionar 10 µl de solução do anticorpo secundário biotilado diluído (1:300) em solução de lavagem (por 40 min, e lavar 3X na mesma solução sem o anticorpo).

4. Incubar o material com 10 µl de estreptavidina marcada com FITC diluída (1:10) em PBS por 20 min e lavar 5X.

5. A seguir, os cortes são colocados em lâmina cobertas com poli-L-lisina (promove a aderência do material) e observados sob microscópio equipado para fluorescência.

Vantagens: a sensibilidade do método é maior que do ELISA ficando em torno de 10^3 a 10^4 células/ g de tecido vegetal (Van Vuurde & Roozen, 1990) e mesmo concentrações muito baixas do fluorocromo (ex.: 10^{-18} g) podem ser detectadas através do microscópio de

fluorescência. Outra vantagem é a marcação dupla ou tripla alcançada apenas pela modificação do comprimento de onda para excitação.

Desvantagens: permite estudos de localização específica mas não é usado para quantificação devido a restrita área de visualização. Para tal são necessários a avaliação de um grande número de amostras que são cansativas e demandam um longo tempo. Outras técnicas imunológicas permitem a quantificação mais rápida, eficiente e reproduzível. Também não distingue células viáveis de não cultiváveis. Para tal temos a marcação fluorescente de colônias (immunofluorescence-colony staining - IFC) que detecta bactérias cultiváveis no limite de 10-100 bactérias por ml de extrato (Leeman et al., 1991; Underberg & Van Vuurde, 1990).

Muitos dos problemas que limitam a utilização de imunofluorescência advém do próprio microscópio ótico. As amostras de plantas são geralmente mais grosseiras pois não são seccionadas (amostras frescas). Desta forma, o campo de visualização fica prejudicado pelas áreas não focadas. Para minimizar tais problemas foi desenvolvido o microscópio confocal com scanning a laser (Scanning confocal laser microscopy - SCLM) que ajusta as distorções advindas do focus limitado em amostra espessas e diminui reações de background do sinal de fluorescência em amostras de solo e planta. Simplificadamente, podemos dizer que o SCLM funciona da seguinte forma: um único feixe laser passa por um orifício onde os sinais só podem ser detectados numa única direção, eliminando assim os sinais oriundos das partes não focadas. Também permite análise seqüencial de diferentes planos do tecido, gerando imagens tridimensionais após análise de imagem acompanhada por um computador equipado com um programa específico.

3.2. *Imunouro*

3.2.1. Sistema de detecção

Partículas de ouro coloidal apresentam vantagens de uso sobre outros marcadores tais como a ferritina, a diaminobenzidine ou enzimas como a peroxidase que são aplicadas em estudos imunohistoquímicos. Esta vantagem deve-se ao fato de que o ouro coloidal é formado por partículas eletrôn-opacas e uniformes na forma, distinguindo-se de estruturas biológicas e muito visíveis mesmo em baixa magnificação (4000 vezes, dependendo da imunomarcação). A combinação de técnicas de imunomarcação com anatomia vegetal e visualização através do uso

de microscopia ótica e eletrônica (varredura e transmissão) permitiu estudar a interação planta-bactéria associada a identificação específica dos diazotróficos endofíticos (James *et al.*, 1994), identificar biomacromoléculas importantes na interação, como por exemplo a nitrogenase (Hurek *et al.*, 1991; Olivares *et al.*, 1997) ou outros compostos como glicoproteínas, celulose, pectina (James *et al.*, 1991).

A marcação com ouro associada ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), utiliza seções ultrafinas (50-80 nm) do tecido e combina o seu alto poder de resolução com a detecção específica e semi-quantitativa dos ensaios de imuno-marcação. Em laboratórios não equipados com MET, a técnica de imuno-ouro pode ser acoplada a amplificação do sinal com íons de prata e visualização ao microscópio ótico de seções semi-finas (1-2 μ m). Para tal as amostras precisam ser fixadas, desidratadas, embebidas em resina e após a infiltração, polimerizadas em cápsulas de gelatina formando blocos que podem ser cortados.

A produção de partículas coloidais de ouro utilizam a redução controlada do ácido tetracloroaurico variando o agente redutor. O tamanho da partícula depende do grau de redução do ouro. O método do citrato de sódio (Frens, 1973) produz partículas monodispersas variando de 10 a 150 nm em diâmetro, dependendo da concentração de citrato. Tem-se também o método do citrato de sódio em mistura com ácido tânico (Slot & Geuze, 1985) e produz partículas variando de 3 a 15 nm. A utilização do ácido tânico gera partículas mais rapidamente que o citrato, portanto, maiores proporções de ácido tânico resultam em partículas menores e ambos os métodos possuem coeficientes de variação muito baixos. A seguir, as partículas precisam ser estabilizadas com macromoléculas para prevenir a floculação quando colocados numa solução eletrolítica. A estabilização ocorre num pH perto do pI da proteína usada. As mais comuns são a proteína-A e anticorpos secundários. A proteína A-ouro é muito usada especialmente com anticorpos produzidos em coelhos. É extraída da bactéria *Staphylococcus aureus* ligando-se a fração Fc da imunoglobulina G (IgG), não interferindo com a habilidade do anticorpo de se ligar ao antígeno. Como esta proteína possui pouca afinidade para IgGs de cabras, ratos e camundongos, utiliza-se neste caso a proteína-G derivada da parede celular do estreptococo estirpe G.

Anticorpos secundários marcados com ouro são usados normalmente tanto para acoplagem com anticorpos monoclonais como para policlonais. Para tal deve-se utilizar o anticorpo secundário desenvolvido no mesmo animal em que se produziu o soro e vendido

comercialmente. Como outra alternativa, pode-se usar o sistema estreptavidina-ouro com anticorpos secundários biotinilados através de um sistema simples ou de dupla marcação.

3.2.2. Preparação das amostras

a. Fixadores

No nosso caso, será aplicado apenas a fixação química através do uso de substâncias que reagem com determinados sítios das biomoléculas no sentido de promover uma estabilização. Existem outras formas de fixação de moléculas através de métodos físicos que geralmente fazem uso de baixas temperaturas (maiores detalhes ver Sesso, 1989)

Dentre os vários produtos que podem ser aplicados temos duas classes: os aditivos e os não aditivos. Na classe dos não aditivos, está incluído o etanol que usado diretamente sobre a amostra faz denaturar as proteínas devido a sua ação coagulante, alterando bastante a sua configuração. Por isso, o etanol não é utilizado em microscopia eletrônica.

No grupo dos fixadores aditivos temos os aldeídos fórmico e glutárico, a acroleína e o tetróxido de ósmio. Após a sua adição ocorre a estabilização estrutural através de ligações entre as moléculas do fixador com as macromoléculas teciduais sem promover contudo uma distorção muito acentuada (ligações cruzadas entre os componentes estruturais). Sua ação torna as proteínas não coaguláveis, o que permite que se use o etanol e a acetona nas fases de desidratação (maiores detalhes ver Sesso, 1989).

O fixador ideal é aquele que preserva a ultraestrutura sem perda de antigenicidade. Entretanto, como a maioria dos anticorpos são produzidos com antígenos nativos e não fixados, é difícil conseguir que ambos os objetivos sejam alcançados plenamente. Desta forma, um único protocolo não satisfaz a todos os experimentos imunohistoquímicos. O passo inicial faz uso de agentes fixadores tais como os aldeídos. O glutaraldeído é um dialdeído que se liga a proteínas de uma melhor forma que o paraformaldeído, que é um monoaldeído, resultando numa melhor preservação da ultraestrutura mas que ainda assim pode diminuir ou eliminar o reconhecimento do anticorpo (Sesso, 1989). O paraformaldeído, em diversas concentrações (2-5%), tem sido o substituto do glutaraldeído (VandenBosch, 1991). Um meio termo entre a preservação da ultraestrutura e dos sítios antigênicos na fixação do material biológico para aplicação em imunohistoquímica é a utilização do paraformaldeído (2-5%) e glutaraldeído em baixas concentrações (0,1%). Para tal, usar 0,1% de glutaraldeído (solução estoque 25% - comercial) +

4% de paraformaldeído (a partir solução estoque - formulação descrita a seguir) em tampão cacodilato (0,1M pH 7,2) ou tampão fosfato (0,1M pH 7,1).

A pós-fixação com tetróxido de ósmio pode mascarar os sítios antigênicos causando uma redução substancial no número de partículas de ouro ligadas na secção. Desta forma, é geralmente omitido dos protocolos imunohistoquímicos. No entanto, se é realmente necessária a preservação da ultraestrutura para imuno-marcação, deve-se tratar os grids metálicos com metapriodato de sódio (0,56 M sol. aquosa) por 1 hora, no intuito de expor os sítios antigênicos ocultos pelo ósmio, lavando em seguida com água destilada.

Preparo da solução estoque de paraformaldeído:

Método I: Solução aquosa de paraformaldeído (40%).

Dissolver 40 g de paraformaldeído (pó) em 95 ml de água bidestilada aquecendo até 65°C sob agitação. Quando a solução estiver dissolvida, porém ainda turva, adicionar algumas gotas de NaOH (40%). A solução irá clarear. Após esfriar completamente, completar para 100 ml com água bidestilada. Esta solução pode ser continuamente diluída com a solução tampão escolhida (cacodilato ou fosfato) para uma concentração final de 4%. Sempre que for usar, checar o pH.

Método II: Solução tamponada de paraformaldeído (5%).

Aqueça 45 ml de tampão fosfato ou cacodilato (0,2 M; pH 7,4) até 65°C. No início do aquecimento, adicione 2,5 g de paraformaldeído e agite continuamente. A solução permanecerá turva. Adicione gotas de hidróxido de sódio (2 N) e continue agitando até a solução clarear. Após resfriar, complete para 50 ml. Checar o pH antes do uso.

A fixação da amostra usando solução de paraformaldeído tamponada (5%) apresenta um baixo número de ligações cruzadas entre as biomoléculas e dessa forma deixará livre um número apreciável de sítios antigênicos reativos para detecção por métodos imunohistoquímicos.

b. Resinas

Métodos imunohistoquímicos necessitam a utilização de resinas hidrofílicas como as do grupo das resinas acrílicas polares (LR White, Lowicryl K4M). A resina London LR White é a alternativa mais popular para estudos imunohistoquímicos em tecidos de plantas. É uma

resina acrílica aromática, hidrofílica, com alta retenção da antigenicidade e baixo número de reações inespecíficas. Serve para uso em microscópio ótico e eletrônico, é fácil de seccionar e infiltra bem no tecido vegetal. Para o seu uso, após a fixação e lavagem da amostra com tampão, desidrata-se a amostra com a série alcoólica de etanol (10,30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 % durante 10 min para cada etapa). Na etapa de infiltração pode-se adotar misturas de resina com álcool para uma infiltração lenta (mistura 2:1, LR White : etanol 100%, 1h). Em nosso laboratório, por economia, embebemos a amostra na resina pura por um dia, trocamos por resina nova e deixamos embebendo por 6 dias na geladeira. Transfere-se então as amostras para cápsulas de gelatina, identificando-as com um pequeno papel e em seguida coloca-se a amostra orientada e embebe-se com resina nova. Polimeriza-se as amostras a 55-60°C por 24 hs.

As amostras são cortadas na espessura de 50 a 90 nm e coletadas em grids de níquel ou ouro (metais inertes). Os grids são cobertos com um filme de Formvar (0,4% em clorofórmio e espera-se 24 hs para a total homogeneização). Para cobrir os grids com Formvar é necessário que se produza o filme através do uso de lâminas de vidro novas. Mergulha-se a lâmina na solução de Formvar e deixa-se secar. A seguir passa-se a gilete nas bordas da lâmina e mergulha-se em água perpendicularmente. Este procedimento permitirá que o filme se solte da lâmina e fique sob a superfície da água. Colocar os grids invertidos sobre a película que está flutuando na água. Recolher o filme com a ajuda de parafilme, secar e usar.

3.2.3. Marcação com ouro

Marcação com ouro para MET

- Toda reação se processa em um pequeno pedaço de filme plástico (PARAFILM).

1. Obtenção dos cortes:

Seções ultrafinas (50-90 nm) incluídas em LR White devem ser recolhidas em grades de níquel ou ouro, cujo mesh (tamanho da grade) pode variar em função da amostra. Na maioria das vezes indica-se o uso de grades de 300 mesh recobertas com FORMVAR.

2. Hidratação e bloqueio:

Esta etapa tem como função permitir a penetração dos anticorpos e bloquear os grupamentos reativos não específicos. Para tal, coloca-se as grades com os cortes voltados para

baixo sobre a superfície da gota (40-50 µl) contendo a solução de bloqueio (solução IGL) por um período de 1 hora à temperatura de 20-25°C.

Solução IGL: 1% BSA, 1% Tween 20, diluídos em PBS (pH 7,4).

3. Marcação primária e secundária:

Transferir diretamente da solução IGL para o anticorpo primário, deixando por 1-4 horas à temperatura ambiente. O anticorpo é diluído em solução IGL na proporção de 1:400, utilizando uma gota de 40-50 µl. A seguir deve-se lavar a grade em água destilada estéril (passando por duas gotas ou diretamente com um “piset” cuidadosamente). Remover o excesso de água com um papel de filtro e incubar a grade em anticorpo secundário, anticorpo-ouro ou proteína-A-ouro (antibody-gold ou protein A-gold, diluído 1:50 em solução IGL) por 1-2 horas a temperatura ambiente. Após este período lavar uma vez com solução IGL e duas vezes em água destilada estéril.

4. Retirar o excesso de água e corar as grades com acetato de uranila (5%) por 10 min. e citrato de chumbo (0,2%) por 2 min. É importante ressaltar que este tempo funciona bem para tecidos foliares, colmos e nódulos. Para seções de raízes e tecidos de animais devemos dobrar o tempo de contraste. Usando-se partículas muito pequenas de ouro deve-se omitir o citrato de chumbo para reduzir o contraste.

Os controles devem constar de: a) soro pré-imune (tirado antes da imunização do animal) é o melhor controle. b) sem o anticorpo primário: permite visualizar reações inespecíficas com o anticorpo secundário. c) amostra sem o organismo alvo: controle negativo, testemunha não inoculada.

a. Marcação dupla

1. para anticorpos produzidos em animais diferentes usa-se partículas de ouro de tamanhos diferentes.

2. uso da marcação com proteína A-ouro para detectar o diferentes anticorpos primários, sendo que o ouro com tamanhos diferentes. Neste caso faz-se a incubação dos anticorpos separadamente (Titus & Becker, 1985).

3. uso de anticorpos biotinilados e marcação com estreptavidina-ouro para detectar o segundo antígeno Bradley et al., (1986). Usa-se dois anticorpos produzidos em coelhos, por exemplo; um se detecta com goat anti-rabbit-ouro e o segundo usa-se anticorpo biotinilado e

revela-se com estreptavidina-ouro. Para que o anticorpo com ouro não se ligue aos dois soros primários, incuba-se separadamente.

Após a adição do anticorpo primário, lava-se e adiciona-se o anticorpo secundário marcado com biotina diluído na solução de lavagem e incuba-se por 2 hs a temperatura ambiente. Lava-se o slide 3 vezes e adiciona-se a estreptavidina-ouro diluída na solução de lavagem de acordo com a recomendação do fabricante. Incuba-se 1 h a temperatura ambiente. Lava-se 3 vezes, cora-se e observa-se ao microscópio eletrônico de transmissão.

b. Enriquecimento com prata

O depósito de prata metálica sobre as partículas de ouro, amplifica o sinal para visualização ao microscópio ótico em seções semi-finas. O princípio deste método baseia-se na incubação de um revelador contendo sal de prata e um agente redutor. A precipitação da prata metálica cobre o sítio antigênico com um denso depósito opaco visível ao microscópio ótico. Como vantagens temos: mais sensível que a peroxidase e mais permanente que a fluorescência sem os problemas de autofluorescência da amostra. A companhia Janssen Life Science produz um revelador que possui vantagens aos usados anteriormente: longa vida de uso, relativamente insensível a qualidade da água, pode ser usado sob luz. O produto possui o nome de IntenSE LM e tem sido usado com êxito em nosso laboratório.

- Todas as reações são realizadas em lâmina de vidro.

1. Seções semi-finas (1µm) são recolhidas em gota de água em lâminas de vidro cobertas com poli-L-lisina (1%) e $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ (0,01%) ou gelatina (1%) ou agarose (0,2%) e colocadas para secar a 60°C.

2. As seções são incubadas em tampão IGL por 1 hora a 20-25°C.

3. Lava-se com água destilada esterilizada rapidamente e incuba-se com o anticorpo primário entre 1 e 4 horas a 20-25°C. Novamente as seções são lavadas com água destilada esterilizada utilizando-se um “piset” cuidadosamente. Incuba-se com solução IGL por 3X (5 min. cada seção) e lava-se com água destilada estéril. Incuba-se com o anticorpo secundário (dil. 1:50 em sol. IGL) por 1-2 horas. Lava-se como anteriormente. Deixe secar e aplique o revelador de prata (tempo médio de revelação 9-10 min. a 22-25°C), é recomendável após 5 min. da aplicação da prata, avaliar sua reação ao microscópio ótico. No ponto ótimo, lavar com água e corar com azul de toluidina (0,01%).

4. PERSPECTIVAS DE USO

Todas as técnicas descritas acima foram testadas em nossos laboratórios e estão sendo usadas nos estudos de localização de bactérias diazotróficas em plantas associadas a rizóbios e plantas associadas a bactérias ditas associativas (como as do gênero *Azospirillum*) e endófitas (*A. diazotrophicus* e as do gênero *Herbaspirillum*). Estes microrganismos já foram bem caracterizados quanto a sua ecologia, fisiologia, sobrevivência e competitividade. Estudos de localização só podem ser aplicados após estas primeiras fases de estudo. Isto se deve principalmente ao custo da amostra analisada e ao tempo gasto desde o preparo até a finalização de um estudo conclusivo. Vale ressaltar que para microrganismos que não apresentam nenhuma estrutura visual que permitam a sua localização exata, o tempo gasto ainda é maior.

Como citado anteriormente, a aplicação de técnicas imunocitológicas é vital para o conhecimento das inter-relações solo-planta-microrganismos e etapas como as descritas neste comunicado não devem ser excluídas em estudos de ecologia microbiana. Sua aplicabilidade é de grande valor para futuros usos de qualquer microrganismo benéfico na agricultura e deve ser priorizada.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a colaboração do bolsista de mestrado Fábio Bueno dos Reis e da pesquisadora Dr^a. Norma G. Rumjanek pela correção do texto e a Sr^a Dorimar dos Santos Félix, pela correção nas referências bibliográficas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, D.D.; MULLIN, B.C. Diversity of Frankia nodule endophytes of the actinorhizal shrub *Ceanothus* as assessed by RFLP patterns from single nodules lobos. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.547-552, 1994.

- BASHAN, Y.; MITIKU, G.; WHITMOYER, R.E.; LEVANONY, H. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.132, p.73-83, 1991.
- BOHLOOL, B.B.; SCHIMIDT, E.L. Nonspecific staining: Its control in immunofluorescence examination of soil. **Science**, Baltimore, v.162, p.1012-1014, 1968.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I. et al., ed.. **Azospirillum IV and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.1-14, 1995.
- BRADLEY, D.J.; BUTCHER, G.W.; GALFRE, G.; WOOD, E.A.; BREWIN, N.J. Physical association between the peribacteroid membrane and lipopolysaccharide from the bacteroid outer membrane in *Rhizobium*-infected pea root nodule cell. **Journal of Cell Science**, Essex, v.85, p.47-61, 1986.
- CURL, E.A.; TRUELOVE, P. **The rhizosphere**. Berlin: Spring-Verlag, 1989. p.77-79.
- DUGUID, J.P.; OLD, D.C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. In: BEACHEY, E.H., ed. **Bacterial adherence receptors and recognition**. London: Chapman, 1980. p.185-217.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, M.M. The distribution of some fungal and bacteria endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Oxford, v.122, p.299-305, 1992.
- FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold solutions. **Nature Physiology Science**. v.241, p.20-22, 1973.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by "Azoarcus". **Development in Plant and Soil**, Dordrecht, v.48, p.235-242, 1991.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.
- JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; MINCHIN, F.R.; BREWIN, N.J. Intercellular localization of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.14, p.467-476, 1991.

- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of Sugar Cane By The Nitrogen-Fixing Bacterium *Acetobacter diazotrophicus*.. **Journal of Experimental Botany**, London, v.45, p.757-766, 1994.
- KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1219-1232, 1992.
- HARLOW, E.; LANE, D. Labeling antibodies. In: HARLOW, E.; LANE, D., ed. **Antibodies, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. p.344-349.
- LEEMAN, M.; RAAIJMAKERS, J.; BAKKER, P.; SCHIPPERS, B. Immunofluorescence colony staining for monitoring pseudomonads introduced in soil. In: BEEMSTER, A., ed.. **Biotic Interactions and Soil-borne Diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.374-380.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLRIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within roots by immunogold labelling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, p.207-218, 1989.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.24, p.734-742, 1978.
- PINHEIRO, R. de O. **Investigação da adesão de *Azospirillum* spp. às raízes de trigo**. Itaguaí: UFRRJ, 1992. 110p. Tese de Mestrado.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; ASSIS, J.R.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 11p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 30).
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, London, v.135, p.723-737, 1997.
- SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONOV, G.E.; MERLI, S. Isolation of endophytic streptomyces strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2691-2693, 1992.

- SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. de, ed. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. p.1-36.
- SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, U.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp 7 and Sp 245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., ed. **Nitrogen Fixation with Non-legumes**. Cairo: American University of Cairo Press, 1994. p.291-297.
- SCHLOTTER, M.; MOENS, S.; CROES, C.; REIDEL, G.; ESQUENET, M.; DEMOT, R.; HARTMANN, A.; MICHIELS, K. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain specific monoclonal antibodies. **Microbiology**, New York, v.140, p.823-828, 1994.
- SLOT, J.W.; GAUZE, H.J. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v38, p.87-93, 1985.
- TITUS, D.E.; BECKER, W.M. Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition using double-label immunoelectron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Essex, v.101, p.1288-1299, 1985.
- UNDERBERG, H.; VAN VUURDE, J. *In situ* detection of *Erwinia chrysanthemi* on potato roots using immunofluorescence and immunogold staining. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOLOGY AND BACTERIOLOGY, 7., 1990, Budapest. **Proceedings...** Budapest: Akademiai Kiado, 1990. P.937-942. (Editado por Z. Klement).
- VAN VUURDE, J.; ROOZEN, N. Comparison of immunofluorescence colony-staining in media, selective isolation on pectate medium, ELISA and immunofluorescence cell staining for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in cattle manure. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.96, p.75-89, 1990.
- VANDENBOSH, K.A. Immunogold labelling. In: HALL, J.L.; HAWES, D., ed. **Electron microscopy of plant cells**. London: Academic, 1991. p.181-218.