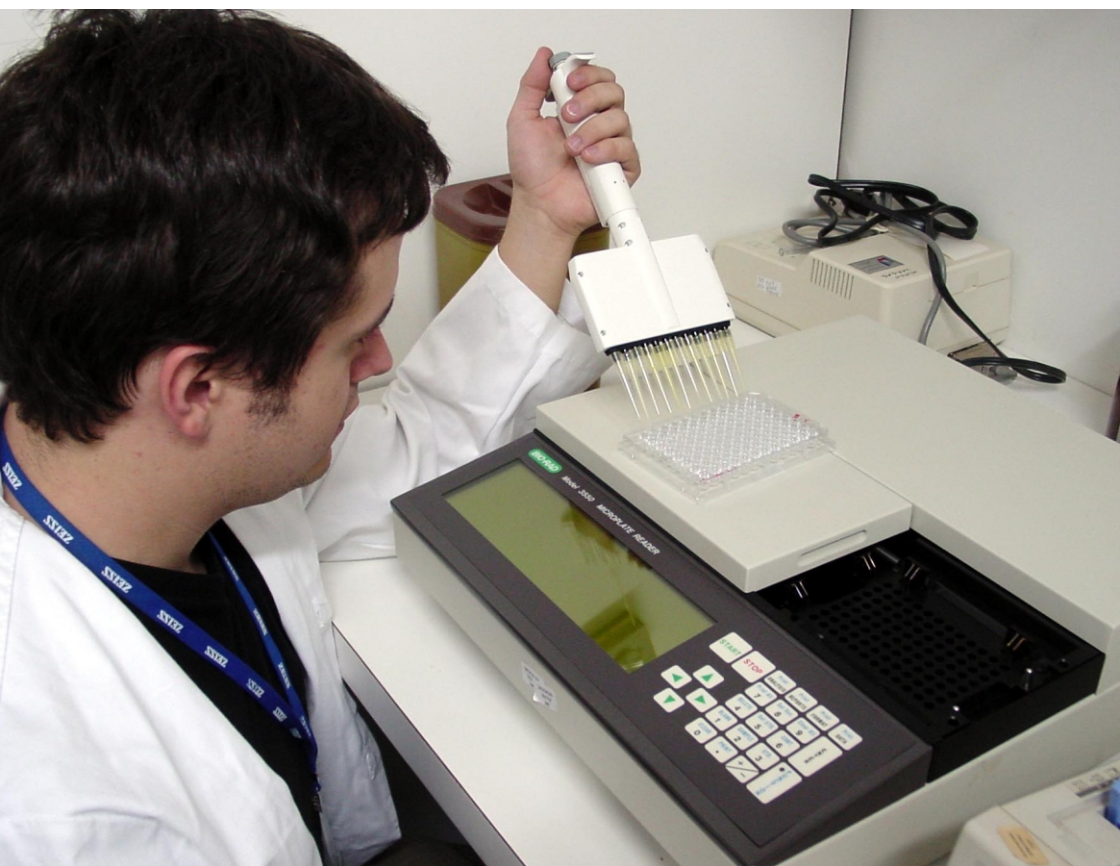


Utilização das Técnicas de ELISA e BIOLOG para Estudos de Diversidade Intra-específica em Isolados de *Azospirillum amazonense* Associados a Diferentes Espécies de *Brachiaria*



Documentos 84

Utilização das Técnicas de ELISA e BIOLOG para Estudos de Diversidade Intra- específica em Isolados de *Azospirillum amazonense* Associados a Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior
Kátia Regina dos Santos Teixeira
Verônica Massena Reis

Planaltina, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Jaime Arbués Carneiro*

Revisão de texto: *Jaime Arbués Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Tratamento das ilustrações: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Foto da capa: *Fábio Bueno dos Reis Junior*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*
Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

R375u Reis Junior, Fábio Bueno dos.

Utilização das técnicas de ELISA e BIOLÓG para estudos de diversidade intra-específica em isolados de *Azospirillum amazonense* associados a diferentes espécies de *Brachiaria* / Fábio Bueno dos Reis Junior, Kátia Regina dos Santos Teixeira, Verônica Massena Reis – Planaltina : Embrapa Cerrados, 2003.

34 p. — (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 84)

1. Solo - microbiologia. 2. Bactéria. 3. Fixação de nitrogênio.
I. Teixeira, Kátia Regina dos Santos. II. Reis, Verônica Massena.
III. Título. IV. Série.

631.46 - CDD 21

© Embrapa 2003

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados

fabio@cpac.embrapa.br

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Biól., Ph.D., Embrapa Agrobiologia

katia@cnpab.embrapa.br

Verônica Massena Reis

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Agrobiologia

veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

Por representar uma possibilidade de menor utilização de insumos, principalmente nitrogênio fertilizante, estudos envolvendo microrganismos fixadores de N e/ou promotores de crescimento de plantas, associados a gramíneas forrageiras, são de grande interesse. Neste documento, que também mostra os aspectos teóricos e práticos da utilização da metodologia de ELISA e do BIOLOG, buscou-se verificar o efeito do genótipo da planta e dos sítios de coleta sobre a diversidade intra-específica de isolados de um destes microrganismos, *Azospirillum amazonense*, oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*. Trabalhos como este contribuem com informações importantes para a geração de conhecimento sobre a FBN em plantas forrageiras. Esperamos que, no futuro, este conhecimento gerado possa vir a contribuir para a sustentabilidade das pastagens, representando um melhor uso da terra com a consequente preservação dos ecossistemas ainda intactos.

Roberto Teixeira Alves

Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
<i>Azospirillum amazonense</i> e Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em <i>Brachiaria</i>	9
Diversidade Intra-específica	10
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	10
BIOLOG	11
Objetivo	12
Material e Métodos	12
Isolados bacterianos	12
Utilização de métodos imunológicos (ELISA indireto)	15
<i>Produção e caracterização da qualidade de anticorpos produzidos para Azospirillum spp. e Herbaspirillum seropedicae</i>	15
<i>Produção do anti-soro</i>	15
<i>Procedimento para o método de ELISA</i>	16
<i>Estudos de diversidade com resultados de ELISA</i>	17
<i>Avaliação da diversidade baseada no uso de fontes de carbono (BIOLOG)</i>	17

Resultados e discussão	18
Aplicação de métodos imunológicos	18
<i>Produção e caracterização da qualidade de anticorpos produzidos para Azospirillum spp. e Herbaspirillum seropedicae</i>	18
Determinação dos títulos dos anti-soros	18
Determinação da especificidade dos anti-soros	19
Estudos de diversidade com resultados de ELISA	19
Avaliação da diversidade baseada no uso de fontes de carbono (BIOLOG)	24
Conclusões	28
Referências Bibliográficas	28
Abstract	34

Utilização das Técnicas de ELISA e BIOLOG para Estudos de Diversidade Intra-específica em Isolados de *Azospirillum amazonense* Associados a Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior; Kátia Regina dos Santos Teixeira; Verônica Massena Reis

Introdução

Azospirillum amazonense* e Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em *Brachiaria

A limitação de nitrogênio é um dos mais importantes fatores que levam à degradação das pastagens ([Oliveira et al., 1997](#)). Entretanto, existe a possibilidade de que parte desse nutriente possa ser disponibilizado pela FBN, que em alguns genótipos de *Brachiaria*, poderia ser responsável pela introdução de 30 a 40 kg de N.ha⁻¹.ano⁻¹ no sistema solo-planta ([Boddey & Victoria, 1986](#); [Loureiro & Boddey, 1988](#)). Dentre as espécies de bactérias diazotróficas associadas a essas plantas, *Azospirillum amazonense* merece destaque por apresentar alta incidência e altos números em associação com *Brachiaria* ([Souto, 1982](#); [Baldani, 1984](#)) e adaptabilidade a pH ácido ([Magalhães et al., 1983](#)), característica comum à maioria dos solos brasileiros.

Como a diversidade de microrganismos do solo e daqueles encontrados no interior das plantas está condicionada à própria vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Brachiaria* possam exercer um efeito seletivo sobre as populações dos microrganismos, o que poderia resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida nestes genótipos.

Diversidade Intra-específica

O conceito de diversidade que será abordado neste trabalho compreende a diversidade apresentada abaixo do nível de espécie, também chamada de microdiversidade ([Schloter et al., 2000](#)), em que são avaliadas subespécies ou estirpes pertencentes a uma mesma espécie. Vários fatores podem influenciar a microdiversidade, entre eles, a separação espacial, diferenças ambientais e interações específicas bactéria-hospedeiro, sendo que cada um desses fatores deve ser objeto de investigações específicas ([Schloter et al., 2000](#)).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A superfície das células bacterianas contém antígenos que são reconhecidos por induzirem a produção de anticorpos em animais. Dessa forma, esses anticorpos podem ser utilizados na determinação da presença ou ausência de um antígeno específico, na mesma bactéria ou em outra ([Vincent, 1970](#)). As relações antigênicas entre organismos refletem, em grande parte, as suas relações genotípicas e, segundo [Hubálek \(1982\)](#), via de regra, estão de acordo com suas similaridades taxonômicas. Uma vez que a sorologia produz informações de similaridade como um todo, ela é considerada como sendo um método global polifênico com grande conteúdo de informações ([Sokal & Sneath, 1963](#)). [Hubálek \(1982\)](#) cita que os princípios básicos da sorologia comparativa foram descobertos no princípio do século 20, em estudos em que proteínas específicas ou glicoproteínas (antígenos) de um organismo reagem mais intensamente com um anti-soro (anticorpos) preparado contra um antígeno de um organismo similar do que com um anti-soro preparado contra antígenos de organismos não similares.

[Gray & Mansoor \(1996\)](#) afirmam que o pré-requisito para o uso de metodologias sorológicas nos estudos de diversidade é a informação sobre a especificidade do anti-soro, escolhida com base nas relações taxonômicas entre os microrganismos e sua ocorrência nos ambientes a serem estudados.

Segundo [Roitt et al. \(1999\)](#), as técnicas de imunoensaio, utilizando reagentes marcados para a detecção de antígenos e anticorpos, são extremamente sensíveis e econômicas no uso de reagentes. Os ensaios de ELISA são, provavelmente, os mais amplamente utilizados entre os métodos

imunológicos. Uma das vantagens do método é a possibilidade de se realizar vários testes simultaneamente em um período de tempo relativamente curto. A técnica de ELISA está baseada na visualização da reação antígeno-anticorpo por meio de uma reação colorimétrica. O anticorpo é conjugado a uma enzima, formando um complexo protéico, em que a porção do anticorpo se liga ao antígeno e a porção da enzima possibilita a transformação de um substrato em cor mensurável por espectrometria ([Engvall & Perlmann, 1971](#)).

[Gray & Mansoor \(1996\)](#) utilizaram a técnica de ELISA, juntamente com outras técnicas imunológicas, para determinar a relação antigênica de *Arthrobacter*, *Aureobacterium* e outras bactérias de solo de diversos locais. O resultado dessas avaliações foi utilizado na taxonomia desses microrganismos.

[Ribeiro \(1999\)](#) utilizou a metodologia de ELISA para o estudo da diversidade de rizóbios associados ao caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) e verificou que as estirpes estudadas dividiram-se em dois grupos, com e sem semelhança a estirpes padrão de *Bradyrhizobium*.

Alguns estudos sorológicos também demonstraram a possibilidade de marcadores antigênicos diferenciarem estirpes de *Azospirillum* ([De-Polli et al., 1980](#); [Annapurna & Gaur, 1990](#); [Sampaio et al., 1978](#)), evidenciando diferentes graus de especificidade.

BIOLOG

As microplacas BIOLOG testam a habilidade de um microrganismo utilizar e oxidar uma quantidade pré-selecionada de diferentes fontes de carbono. O teste produz um padrão de cor púrpura característica, constituindo uma “impressão digital” metabólica do organismo testado. Todas as fontes de carbono ficam perfiladas e secas em placas contendo 96 poços. O tetrazolium é utilizado para indicar colorimetricamente a utilização dessas fontes de carbono ([BIOLOG, 1999](#)). De acordo com a utilização das fontes, a similaridade entre diferentes isolados pode ser comparada por meio de uma análise de agrupamento ([Konopka et al., 1998](#)).

[Bernards et al. \(1995\)](#) caracterizaram estirpes de *Acinetobacter* utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA e o sistema BIOLOG e observaram que a

análise de agrupamento, gerada com base nos dados de padrões de utilização de diferentes substratos, concordava com os resultados da hibridização DNA-DNA.

[Yohalem & Lorbeer \(1994\)](#) estudaram a diversidade metabólica intra-específica de 218 estirpes de *Burkholderia cepacia* isoladas de cebola, diferentes solos e amostras clínicas. Cada estirpe foi caracterizada com base na sua habilidade catabólica usando-se o sistema BIOLOG. Esses autores mostraram uma forte influência do tipo de solo, sendo que estirpes isoladas do mesmo solo freqüentemente apresentavam similaridade. No entanto, estirpes isoladas de diferentes solos com uma história de cultivo similar não apresentaram similaridade.

[Schloter et al. \(2000\)](#) investigaram a influência de diferentes práticas de cultivo sobre a microdiversidade de *Ochrobactrum* spp. com o uso do sistema BIOLOG e encontraram diferenças marcantes entre solos com cultivo orgânico durante 40 anos, quando comparados com solo cultivado de maneira convencional ou com apenas 2 – 8 anos de cultivo orgânico.

Objetivo

Utilizar as metodologias de ELISA e BIOLOG para estudar a diversidade intra-específica de isolados de *Azospirillum amazonense* oriundos de associações com raízes de *Brachiaria* e verificar os possíveis efeitos do genótipo da planta e dos locais de coleta sobre a diversidade.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Os isolados de *A. amazonense* analisados neste estudo estão listados na [Tabela 1](#), aspecto b. Com fins comparativos, estirpes referência das bactérias diazotróficas *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae* também foram incluídas neste estudo ([Tabela 1](#), aspecto a). Todos os isolados de *A. amazonense* foram obtidos a partir de raízes de *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens* ou *B. brizantha* em pastagens formadas em regiões de Cerrado (Santo Antônio de Goiás – GO) ou Mata Atlântica (Itabela – BA). Detalhes dos sítios de coleta são apresentados na [Tabela 2](#).

Tabela 1. Estirpes referência (a) e isolados de *A. amazonense* obtidos de *Brachiaria* spp. (b) utilizados neste trabalho.

(a)		(b)		
Espécie/Estirpe Referência	Planta	Isolados analisados/planta		
		<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. brizantha</i>
<i>A. lipoferum</i> <i>Sp59^T</i> (ATCC 29707)	Trigo	37	64	27
		38	77	36
		41	79	47
		53	80	48
		72	81	87
<i>A. brasilense</i> <i>Sp7^T</i> (ATCC 29145) <i>Cd^T</i> (ATCC 29729)	<i>Digitaria decumbens</i> <i>Cynodon dactylon</i>	73	82	94
		76	83	104
		118	84	124
		134	86	125
		137	97	131
<i>A. amazonense</i> <i>Cbamc</i> (BR11145) <i>Y2^T</i> (ATCC 35120)	Cana-de-açúcar <i>Hyparrhenia rufa</i>	140	107	138
		141 *	119	139
		142 *	123	143 *
			127	
<i>H. seropedicae</i> <i>Z67 t</i> (ATCC 35892)	Arroz		132	
			135	
			136	

* Com as análises de restrição da região 16S DNAr esses isolados não se agruparam com outras estirpes de *A. amazonense* (dados não apresentados) e devem pertencer a outras espécies.

Tabela 2. Características edafoclimáticas dos sítios de coleta em Goiás e Bahia.

Sítio de Coleta	Classificação dos Solos	pH/H ₂ O	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K +	P	Textura	Classificação de Koeppen (Clima)
0 - 20 cm									
			cmol _c .dm ⁻³		mg.kg ⁻¹				
GOIÁS 16°28'S 49°17'W	Latossolo Vermelho Amarelo	5.3	0.1	3.0	1.7	104.0	2.0	Franco Argiloso	Aw (tropical com estação seca no inverno)
BAHIA 16°39' S 39°30' W	Argissolo Amarelo	5.8	0.2	2.6	1.5	78.0	2.0	Franco Arenoso	Af (tropical sem estação seca)

Ca, Mg and Al extraído em KCl 1N; K e P extraído em solução Mehlich 1 (HCl 0,5 N + H₂SO₄ 0,025 N).

Utilização de métodos imunológicos (ELISA indireto)

Produção e caracterização da qualidade de anticorpos produzidos para *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae*

Soros policlonais foram produzidos a partir de isolados das espécies de bactérias que encontramos associadas a plantas de *Brachiaria* (*Azospirillum amazonense*, *A. lipoferum* e *A. brasilense*). Além do soro para *Herbaspirillum seropedicae*, espécie comumente encontrada em associação com diversas plantas da família gramineae. Os processos de produção e caracterização desse material foram realizados de acordo com [Reis et al. \(1997\)](#), e serão sumarizados a seguir. Esses soros foram utilizados para a análise da diversidade (agrupamento com utilização dos resultados de ELISA indireto) desses organismos, utilizando-se das técnicas descritas por [Schloter et al. \(1995\)](#) e [Ribeiro \(1999\)](#).

Produção do anti-soro

Para a produção dos anti-soros seguiu-se o procedimento relatado por [Reis et al. \(1997\)](#). Foram utilizadas como antígenos células intactas das estirpes bacterianas de *Azospirillum lipoferum* (Sp59), *Azospirillum brasilense* (Sp7), *Azospirillum amazonense* (CBAMC, 27, 37 e 77) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), crescidas em frascos com 50 mL de meio DYGS ([Rodrigues Neto et al., 1986](#)) por 48 h a 30 °C. As células foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 3 mL de água destilada estéril, sendo mais uma vez centrifugado a 5000 g por 10 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido três vezes. Depois da última centrifugação, a massa de bactérias foi ressuscitada em 3 mL de água destilada estéril e tratada termicamente a 90 °C por 30 minutos para inativação e eliminação das proteínas flagelares. Tomou-se 1 mL dessa suspensão de bactérias e misturou-se com 0,5 mL do adjuvante completo de Freund e 0,5 mL de adjuvante incompleto (SIGMA CHEMICAL CO., USA). Utilizou-se 1 mL da mistura para inoculação via subcutânea em cinco pontos diferentes da linha dorsal de coelhos da raça Nova Zelândia (primeira imunização). As imunizações subseqüentes foram feitas utilizando-se 1 mL do antígeno aplicado via intramuscular na coxa, sem a adição de adjuvante, a intervalos variando de 7 a 10 dias. Depois da oitava imunização (uma a cada semana), foram colhidas as amostras de sangue dos coelhos, em média 10 mL, a partir do terço superior das orelhas, utilizando-se uma seringa hipodérmica descartável. O material coletado permaneceu no interior da seringa sendo deixado a temperatura

ambiente na bancada do laboratório por 6 horas. Decorrido esse período, observou-se uma clara separação de fases, uma grande massa sólida coagulada contendo principalmente hemácias e uma fase líquida, o plasma sanguíneo, que foi separado cuidadosamente, centrifugado por duas vezes a 2000 g por 10 minutos visando a remoção do precipitado contendo partículas sólidas e posteriormente colocado em banho-maria a 55 °C por 30 minutos para inativação de proteínas que compõem o sistema complemento. Ao final desse processo, o soro foi identificado e estocado no congelador em frascos de vidro esterilizados e posteriormente avaliado quanto sua reatividade e especificidade em testes de ELISA.

Procedimento para o método de ELISA

O procedimento para o método de ELISA adotado foi o chamado ELISA indireto, segundo metodologia proposta por [Engvall & Perlmann \(1972\)](#), com algumas modificações. O teste ELISA foi utilizado para verificar o título e a especificidade dos soros produzidos. Para isso, promoveu-se o crescimento das estirpes bacterianas em meio DYGS a 30 °C por 24 h a 150 rpm, seguido de centrifugação a 2000 g por 3 minutos de 1 mL desse meio e ressuspensão em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6. Em seguida, foi feito o ajuste da concentração do antígeno para uma densidade ótica (D.O.) igual a $1,0 \pm 0,1$ lida no comprimento de onda $\lambda = 436$ nm. Os poços das placas de ELISA foram então impregnadas com 50 μ L do antígeno calibrado. As placas foram incubadas em geladeira por um período de 16 a 18 horas. Decorrido esse período, os poços foram lavados uma vez com solução de lavagem [solução tampão PBS (g.l-1): NaCl – 8,0; KCl – 0,2; Na₂HPO₄.2H₂O – 1,4; KH₂PO₄ – 0,2 + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA] e as reações inespecíficas foram bloqueadas utilizando soro albumina bovina (BSA solução 3% em PBS) por um período de 30 minutos a 37 °C. Adicionou-se 50 μ L do soro por poço na diluição adequada ao tipo de ensaio, incubando-se a placa por um período de 30 minutos a 37 °C e a seguir lavou-se por três vezes utilizando-se 200 μ L de solução de lavagem por poço. Adicionou-se então 50 μ L do anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra conjugadas com enzima peroxidase produzidas contra imunoglobulinas de coelho, SIGMA CHEMICAL CO., USA) diluído na proporção de 1:1000 em PBS. Incubou-se por 45 minutos a 37 °C e lavou-se os poços com solução de lavagem por 5 vezes. Por fim, adicionou-se 100 μ L de Signal ABTS (Tampão para ABTS – solução estoque: 1,67g de tampão para ABTS em 10 mL de H₂O destilada; solução para o substrato: diluição do tampão para ABTS 1:10 em H₂O destilada acrescentado de 1

mg.mL⁻¹ de ABTS. BOEHRINGER MANNHEIM, Germany). As leituras de absorbância depois do desenvolvimento da reação foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) dotado de um filtro de interferência de 405 nm. Os dados foram armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows.

O título do anti-soro foi determinado pela construção da curva de diluição do anticorpo. As diluições realizadas para o teste de título do soro bruto variaram de 1:100 até 1:5.000.

Para a determinação da especificidade dos anti-soros produzidos, estes foram testados contra diferentes espécies. A concentração de células utilizada para a impregnação das placas foi de 10⁸ células.mL⁻¹. Os níveis de reação cruzada foram calculados em função das porcentagens de reação, que por sua vez foram baseadas nos valores de absorbância obtidos, considerando-se como 100% as reações homólogas de cada anti-soro e 0% a ausência de reação.

Estudos de diversidade com resultados de ELISA

Os valores de densidade ótica, obtidos por meio da metodologia de ELISA, foram transformados em porcentagem de reatividade, considerando-se como 100% as reações homólogas de cada anti-soro e 0% a ausência de reação. Para a análise de agrupamento construiu-se uma matriz de dados com 45 linhas (bactérias) por 7 colunas (anti-soros). Os valores obtidos com a reação de cada um dos isolados com os diferentes anti-soros foram comparados e a distância entre eles foi estimada pelo coeficiente de Bray –Curts ([Ribeiro, 1999](#)), calculado pela fórmula $D_{bc} = Sk(X_{ki} - X_{kj}) / Sk(X_{ki} + X_{kj})$, onde D é igual à distância entre os indivíduos e X_{ki} representa o valor da reatividade da bactéria i com o anti-soro k . Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias ([Bussabe et al., 1990](#)) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 1.8, Exeter Software, USA).

Avaliação da diversidade baseada no uso de fontes de carbono (BIOLOG)

Vários isolados foram agrupados de acordo a utilização de 95 fontes de carbono diferentes. Essa análise foi realizada por meio do uso do sistema BIOLOG.

Os isolados foram crescidos em meio DYGS sólido por 16-24 h a 30° C. Depois desse período as colônias foram retiradas cuidadosamente das placas com o auxílio de um cotonete e suspensas em um fluido inoculante ([BIOLOG, 1999](#)). Posteriormente ajustou-se a concentração das células para 52% de transmitância ($\pm 3\%$) utilizando-se um espectrofotômetro com filtro de 590 nm (BIOLOG Inc., USA). Com o uso de um pipetador multicanal, 150mL dessa suspensão foram então dispostas em cada um dos 96 poços das microplacas BIOLOG GN2 (BIOLOG Inc., USA). Essas placas foram tampadas e incubadas por 16-24 h a 30°C. Depois desse período de incubação, foi avaliado o padrão de poços na cor púrpura, que é característico de cada microrganismo, resultado da utilização de diferentes fontes de carbono. A utilização dessas fontes promove a redução de um indicador tetrazolium fazendo com que ocorra a formação de cor púrpura. De acordo com a utilização dessas fontes, a similaridade entre diferentes isolados pôde ser comparada por meio de uma análise de agrupamento dos dados.

Para a construção de uma matriz binária com os dados obtidos por esse sistema, foram atribuídos valores de 1 ou 0, indicando a utilização ou não de determinada fonte de carbono. Os padrões de utilização dessas fontes foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente "Simple Matching" ([Rohlf, 1994](#)). O agrupamento dos isolados e sua representação gráfica se deram de forma semelhante à descrita anteriormente.

Resultados e discussão

Aplicação de métodos imunológicos

Produção e caracterização da qualidade de anticorpos produzidos para *Azospirillum spp.* e *Herbaspirillum seropedicae*

Os métodos imunológicos tem destacada importância em estudos de ecologia microbiana, sendo aplicados em trabalhos diversos, tais como localização, identificação e análise de comunidades ([Bashan & Holguin, 1997](#)). Para uma aplicação eficaz dessas técnicas, os anti-soros devem preencher vários critérios de qualidade, tais como reação cruzada, limite de detecção etc ([Schloter et al., 1994](#)).

Determinação dos títulos dos anti-soros

Depois da oitava imunização dos coelhos, procedeu-se o teste de titulação dos soros para verificar se a produção de anticorpos havia atingido valores que

possibilitassem sua utilização em testes posteriores. De acordo com [Reis \(1994\)](#), soros que apresentam uma absorbância acima de 0,6 de densidade ótica (D.O.) para diluição 1:1000 são considerados satisfatórios. Esse valor mínimo de D.O. a ser considerado como reação positiva, denominado de linha ou zona de corte, é muito variável. Segundo [Kishinevsky et al. \(1993\)](#), valores de absorbância acima de 0,2 são considerados positivos. Para [Asanuma et al. \(1985\)](#), a zona de corte foi definida como sendo duas vezes a leitura do controle negativo, enquanto que para [Fuhrmann & Wollun II \(1985\)](#), valores 50% acima dos encontrados para o controle negativo eram satisfatórios.

Todos os anti-soros produzidos obtiveram títulos entre 1:100 e 1:5000, com leitura variando de 3,5 a 0,6 de D.O. ([Figura 1](#)). Para a escolha da diluição de trabalho, procurou-se utilizar aquela que fosse a mais reativa, porém, que não provocasse um desperdício desnecessário do anti-soro. Sendo assim, a diluição de trabalho escolhida e utilizada nos testes de ELISA foi de 1:1000.

Determinação da especificidade dos anti-soros

Foram feitos testes simples de reação cruzada entre os soros produzidos e as espécies estudadas neste trabalho. [Silva \(1999\)](#), afirma que, para soro bruto, valores percentuais abaixo de 20% podem ser desconsiderados. De fato, quase todos os soros produzidos e testados contra bactérias de diferentes espécies apresentaram valores abaixo de 20%, mostrando, portanto, grau satisfatório de especificidade (espécie específicos). Apenas os soros produzidos contra *A. amazonense* estirpes CBAMC e isolado 77, obtiveram valores de reação cruzada com *A. lipoferum* (Sp59) um pouco acima de 20% ([Figura 2](#)). Mesmo para bactérias bastante semelhantes genotipicamente, como aquelas que compõe o gênero *Azospirillum*, os soros mostraram boa especificidade.

Estudos de diversidade com resultados de ELISA

No dendrograma construído a partir dos resultados de ELISA indireto, observa-se grande diversidade entre os isolados, com as estirpes de *A. amazonense* formando 5 grupos ao nível de 65% de similaridade ([Figura 3](#)). A formação de grupos com diferentes valores de similaridade pode dificultar a análise dos isolados ao nível taxonômico de espécies. Essa variabilidade encontrada deve-se ao uso de quatro anti-soros policlonais produzidos contra diferentes estirpes de *A. amazonense*, que possibilitaram refletir a diversidade antigênica dos isolados. A utilização de apenas um anti-soro contra cada uma das espécies testadas, provavelmente, seria mais eficiente na análise dos isolados ao nível de espécie.

[Hartmann & Zimmer \(1994\)](#) afirmaram que componentes da parede celular de *Azospirillum* como proteínas e lipopolisacarídeos, podem permitir uma identificação sorológica ao nível de espécies ou estirpes com a utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais. A técnica de ELISA, juntamente com outros métodos imunológicos, foi utilizada para determinar a relação antigênica de *Arthrobacter*, *Aureobacterium* e outros isolados de solo de diversas regiões ([Gray & Mansoor, 1996](#)). O resultado dessas avaliações foi utilizado na taxonomia desses organismos. [Ribeiro \(1999\)](#) agrupou 40 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de caupi em solos da Região Nordeste, utilizando resultados de ELISA indireto. Esse autor observou que esses isolados foram divididos em 10 grupos principais a um nível de 50% de similaridade.

Observando-se os resultados apresentados nas [Figuras 3 e 4](#) nota-se que, com a utilização da técnica de ELISA, os sítios experimentais apresentaram certa influência sobre a diversidade dos isolados de *A. amazonense*. O efeito das espécies de *Brachiaria* sobre a diversidade desses organismos não parece claro. Nas [Figuras 3 e 4](#) a, pode-se notar que a maioria dos grupos formados são relativamente homogêneos em relação ao sítio experimental de onde foram obtidos os isolados. Os grupos I (8 isolados), III (8 isolados) e IV (3 isolados) são dominados (mais que 65%) por isolados de Goiás e o grupo V (5 isolados) por isolados da Bahia. Apenas no grupo II (12 isolados), a diferença entre a frequência dos isolados oriundos de cada sítio foi inferior a 10%. A formação de grupos com poucos isolados dificultam uma análise mais conclusiva, portanto, futuros estudos feitos com um número maior de isolados podem contribuir para um melhor entendimento da relação entre a microdiversidade de *A. amazonense* e os sítios de coleta com suas diferentes condições edafoclimáticas.

Os solos nos sítios de coleta, Latossolo (GO) e Argissolo (BA), apresentam diferenças em importantes características, como textura e capacidade de retenção de água. Sabe-se que caracteres fenotípicos que atuam como determinantes antigênicos, como lipopolisacarídeos e proteínas da membrana, sofrem grande influência de fatores ambientais, tais como grau de aeração, teores de ferro etc ([Davies & Quirie, 1996](#)). Também é conhecido o fato de que teores de argila, nitrogênio e capacidade de retenção de água, podem estar relacionadas com a viabilidade de bactérias do gênero *Azospirillum* no solo ([Bashan et al., 1995a e 1995b](#)). Analisando essas informações, podemos esperar que diferenças quanto ao sítio experimental sejam encontradas.

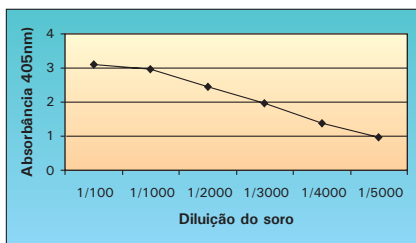
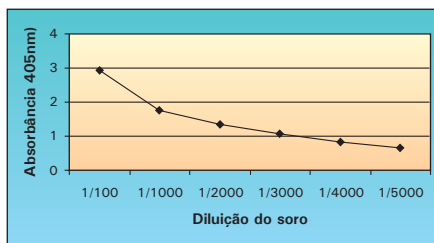
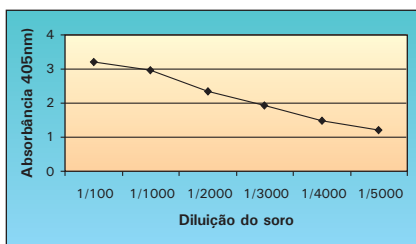
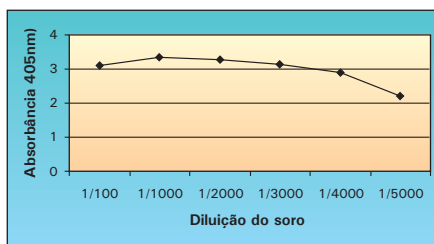
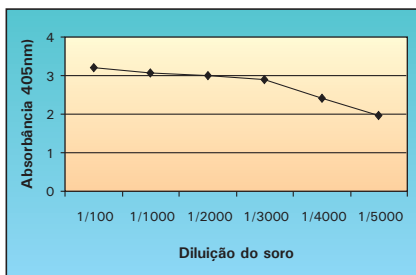
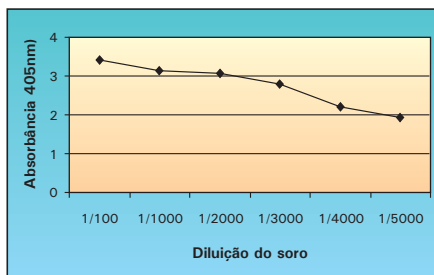
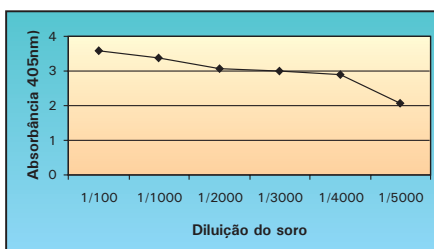
*Herbaspirillum seropedicae* (Z67)*Azospirillum lipoferum* (Sp59)*Azospirillum brasilense* (Sp7)*Azospirillum amazonense* (CBAMC)*Azospirillum amazonense* "tipo" (27)*Azospirillum amazonense* "tipo" (37)*Azospirillum amazonense* "tipo" (77)

Figura 1. Determinação dos títulos dos soros produzidos contra as estirpes de *H. seropedicae* (Z67), *Azospirillum lipoferum* (Sp59), *A. brasilense* (Sp7), *A. amazonense* (CBAMC) e estirpes *A. amazonense* "tipo" isoladas de *Brachiaria* spp. (27, 37 e 77).

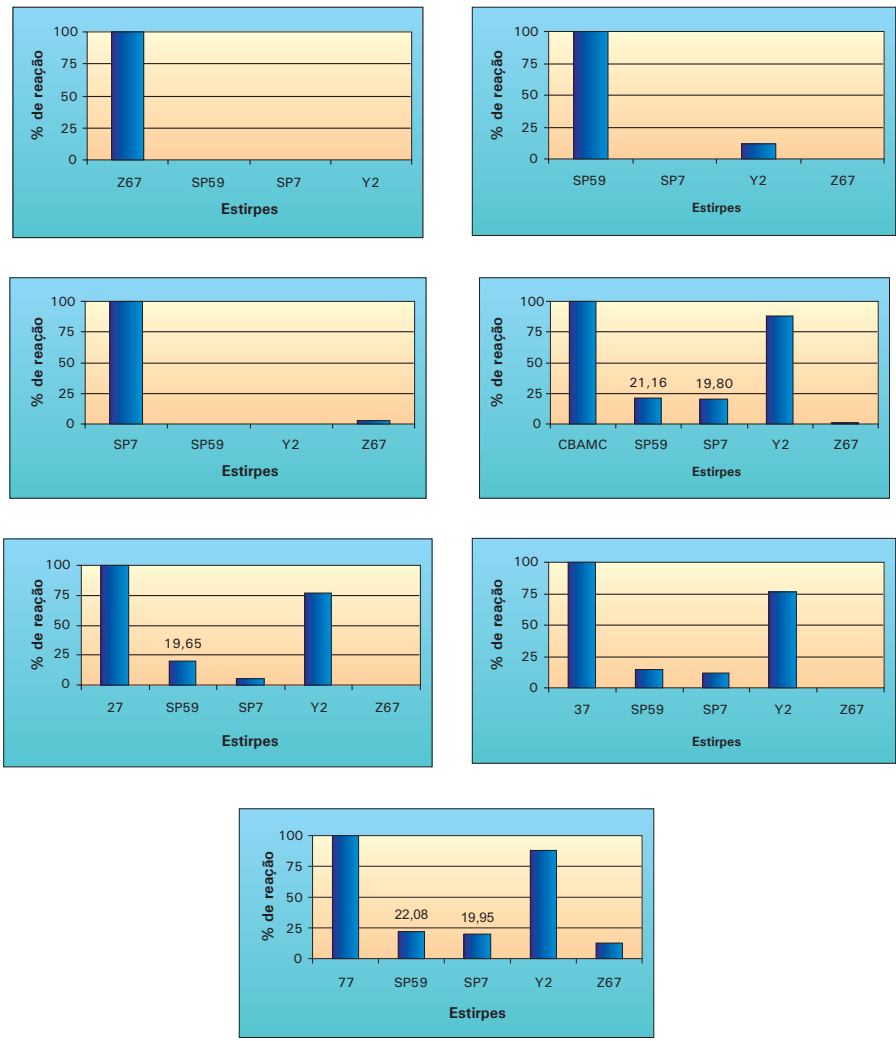


Figura 2. Especificidade dos soros produzidos contra as estirpes de *H. seropedicae* (Z67), *Azospirillum lipoferum* (Sp59), *A. brasilense* (Sp7), *A. amazonense* (CBAMC) e estirpes *A. amazonense* “tipo” isoladas de *Brachiaria* spp. (27, 37 e 77).

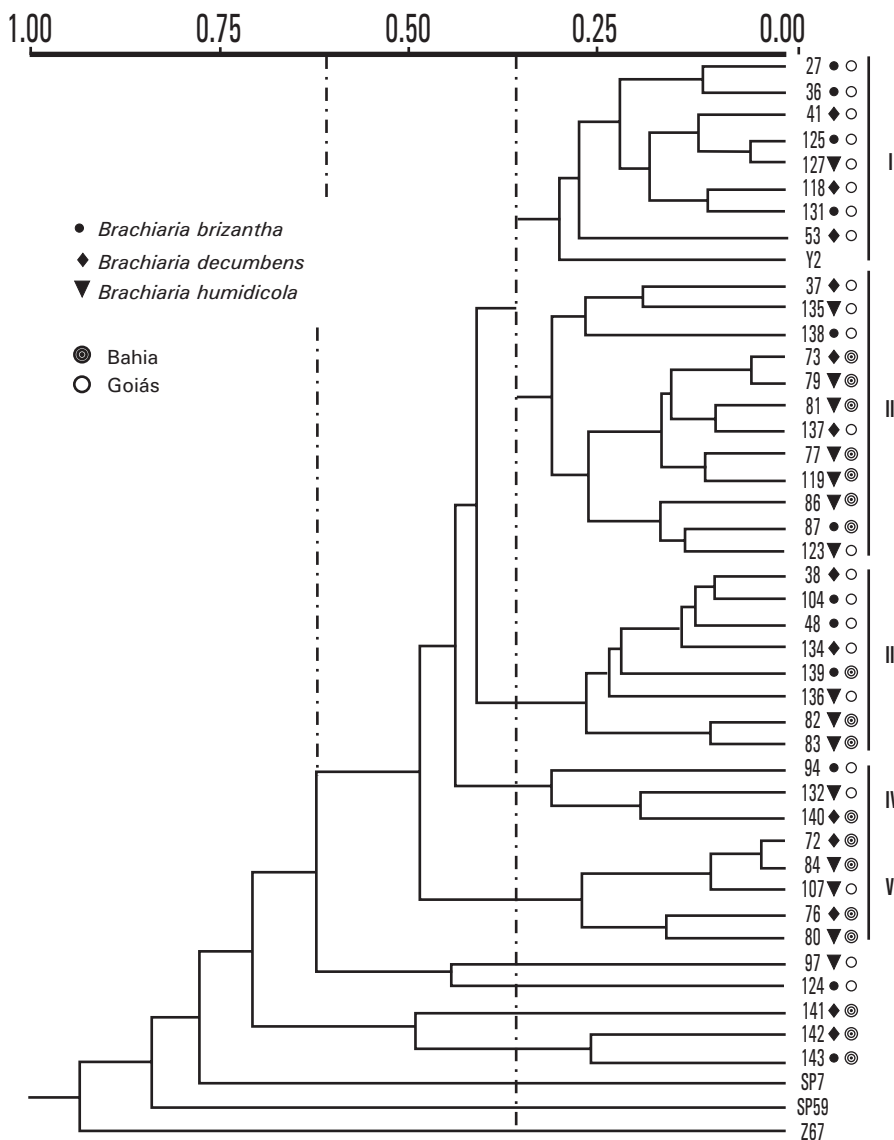


Figura 3. Análise de agrupamento de 41 isolados obtidos da associação com três espécies de *Brachiaria* cultivadas na BA e em GO e das estirpes referência de *Azospirillum amazonense* (Y2), *A. brasilense* (Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), com base na matriz de distância calculada pelo índice de Bray-Curts a partir dos dados obtidos com as reações de ELISA. Foi utilizado como critério de agrupamento o método UPGMA.

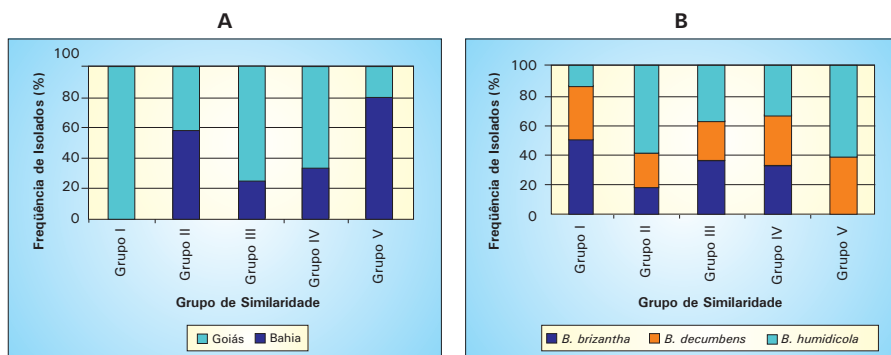


Figura 4. Frequência de isolados de *A. amazonense* em cada grupo de similaridade, apresentado na [Figura 1](#), considerando os sítios de coleta (A) e as espécies de *Brachiaria* associadas a estes isolados (B). As frequências foram obtidas dividindo o número de isolados proveniente de cada sítio (A) ou espécie (B) presentes no grupo pelo número total de isolados do grupo.

Avaliação da diversidade baseada no uso de fontes de carbono (BIOLOG)

O dendrograma construído com base nos dados de utilização das fontes de carbono do sistema BIOLOG pelas bactérias avaliadas, agrupou os 32 isolados de raízes de *Brachiaria* caracterizados fenotipicamente como *A. amazonense* ([Figura 5](#)). A similaridade encontrada entre os isolados de *A. amazonense* e as duas estirpes referência (CBAMC, Y2) foi de no mínimo 85%. As outras estirpes referência formaram grupos distintos, para *A. brasilense* (Cd, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), todos afastados pelo menos 60% de *A. amazonense*.

O sistema BIOLOG foi eficaz no trabalho de confirmação das avaliações morfológicas. O BIOLOG é tradicionalmente utilizado para a identificação de bactérias ([Klinger et al., 1992](#)). [Toth et al. \(1999\)](#) utilizou o BIOLOG para estudar a diversidade nas estirpes de *Erwinia carotovora*, no entanto, esse foi incapaz de mostrar uma diferença clara entre os vários grupos analisados. Esses autores concluíram que *Erwinia carotovora* é nutricionalmente homogênea. [Ross et al. \(2000\)](#), comparando os resultados obtidos com BIOLOG, observaram uma homologia maior que 90% entre estirpes de *Pseudomonas brassicaceum* e *Pseudomonas thivervalensis*.

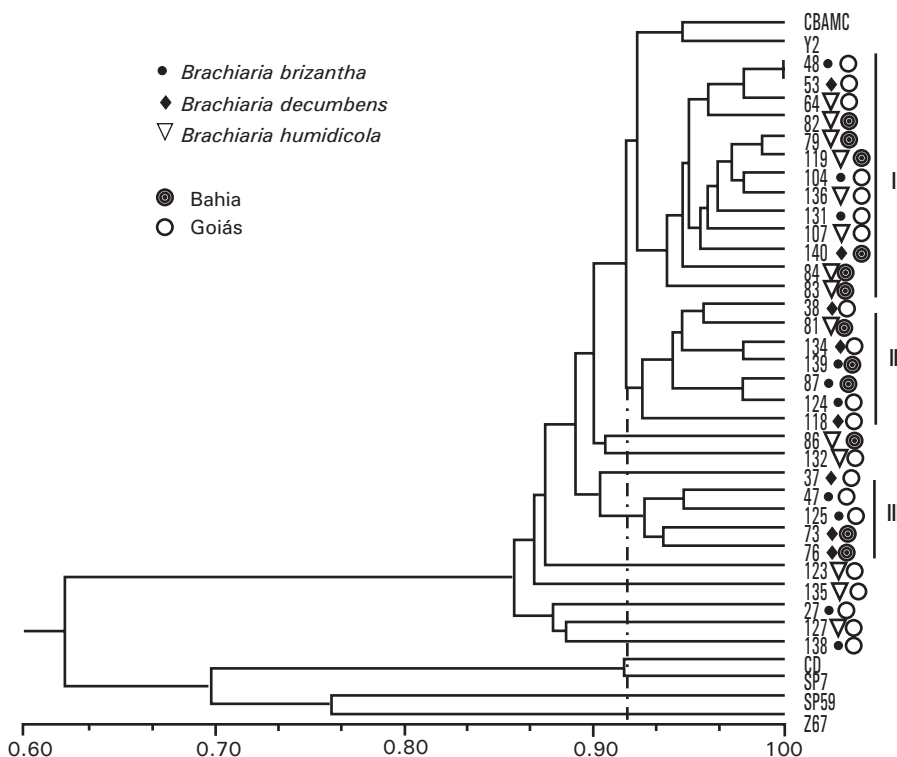


Figura 5. Análise de agrupamento de 32 isolados obtidos da associação entre três espécies de *Bracharia* cultivadas na BA e em GO e das estirpes referência de *Azospirillum amazonense* (Y2 and CBAMC), *A. brasilense* (Sp7 and CD), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), com base na matriz de similaridade calculada pelo coeficiente “Simple Matching” a partir dos resultados do BIOLOG. Foi utilizado como critério de agrupamento o método UPGMA.

Apesar de sua utilização para caracterização de espécies, em alguns casos esse sistema também tem sido utilizado para avaliar a diversidade intra-específica. [Hildebrand et al. \(1993\)](#) relacionaram, com a utilização do BIOLOG, estirpes de *Xanthomonas campestris* de acordo com sua planta hospedeira. Portanto, em comparação com *X. campestris*, assim como mostrado para *E. carotovora* ([Toth et al., 1999](#)), pode-se considerar que diferentes estirpes de *A. amazonense* são bastante similares nutricionalmente.

Ao analisar a formação dos três grupos formados a 92% de similaridade, não observamos efeito do sítio de coleta de onde foram obtidos os isolados, no entanto, mesmo com a alta similaridade apresentada, pode-se notar uma influência da espécie da planta na sua formação (Figuras 5 e 6b). Foi observado que a maioria dos isolados de *B. decumbens* e *B. brizantha* estão distribuídos entre os grupos II e III e os isolados de *B. humidicola* estão concentrados no grupo I. Um fato interessante é que *B. decumbens* cv Basilisk (cultivar de onde foram obtidos os isolados) é na verdade um ecotipo intermediário entre as espécies de *B. brizantha* e *B. decumbens* (Valle et al., 2000). Enquanto *B. decumbens* cv Basilisk e *B. brizantha* cv Marandu são tetraplóides, *B. humidicola* é hexaplóide, segundo Valle et al. (2000), esse tipo de análise permite inferir sobre a distância genética nos acessos de *Brachiaria*.

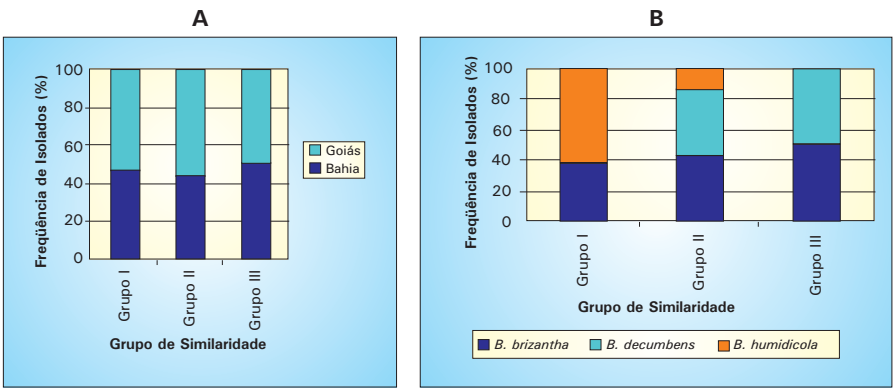


Figure 6. Frequência de isolados de *A. amazonense* em cada grupo de similaridade apresentado na Figura 3, considerando os sítios de coleta (A) e as espécies de *Brachiaria* associadas a estes isolados (B). As frequências foram obtidas dividindo o número de isolados proveniente de cada sítio (A) ou espécie (B) presentes no grupo pelo número total de isolados do grupo.

A composição de plantas em uma determinada área pode influenciar a diversidade da comunidade microbiana devido à variabilidade da composição química de seus exsudatos (Christensen, 1989). Esses compostos influenciam a comunidade microbiana alterando a composição química do solo nas vizinhanças das raízes e servindo como substratos seletivos para o crescimento dos

microrganismos. Na verdade, a variedade de compostos orgânicos liberados pelas plantas tem sido enfatizada como o fator chave de influência na diversidade de microrganismos presentes na rizosfera de diferentes espécies vegetais (Bowen & Rovira, 1991, citado por [Grayston et al., 1998](#)).

Dentre os 95 compostos de carbono que fazem parte do sistema BIOLOG, quatro deles (D-frutose, D-psicose, Ácido acético, Ácido fórmico) destacaram-se por serem mais utilizados por isolados de *B. humidicola* do que por isolados das outras duas espécies (Tabela 3). Como discutido anteriormente, sabe-se que diferentes exsudados radiculares oriundos de plantas diferentes, exercem uma pressão seletiva sobre os organismos da rizosfera, favorecendo isolados com vias específicas para utilização de fontes de carbono que são capazes de explorar diferentes tipos de fonte de carbono. [Ross et al. \(2000\)](#) discutem como um provável fator evolucionário, que estirpes de uma mesma espécie isoladas de plantas diferentes tenham adquirido a capacidade de metabolizar diferentes compostos de carbono.

Tabela 3. Freqüência dos isolados de cada uma das espécies de *Brachiaria*, na utilização de quatro diferentes compostos de carbono.

Origem dos isolados	Compostos de carbono			
	D-frutose	D-psicose	Ácido acético	Ácido fórmico
<i>B. brizantha</i> (10 isolados)	30 %	50 %	20 %	40 %
<i>B. decumbens</i> (8 isolados)	37 %	25 %	12 %	25 %
<i>B. humidicola</i> (14 isolados)	71 %	64 %	64 %	80 %

No trabalho de descrição da espécie *Azospirillum amazonense* ([Magalhães et al., 1983](#)), verificou-se que o composto de carbono D-frutose não era utilizado por essas bactérias. Porém os resultados aqui apresentados indicam que esta fonte pode ser utilizada, com destaque aos isolados provenientes de *B. humidicola*. [Bagwell et al. \(1998\)](#), relataram que algumas bactérias diazotróficas (*Azotobacter chroococcum*, *Vibrio diazotrophicus* e *Rhizobium meliloti*) produziram resultados com o BIOLOG, bastante distintos de seu reconhecido comportamento fisiológico. Esses autores acreditam que o meio utilizado para o crescimento dessas bactérias (Bacto Marine Agar) pode ter sido fator de estresse, gerando resultados atípicos nos testes por eles realizados.

A utilização de diferentes métodos para avaliação da diversidade de *A. amazonense* mostrou possíveis efeitos exercidos pelo tipo de solo e pelas espécies de *Brachiaria*. Na verdade, a análise dos dados aqui apresentados, mostram que esses efeitos poderiam ser um reflexo de uma interação entre a planta e o tipo de solo, ou mais ainda, da interação entre os fatores ambientais determinados pelo tipo de solo/ambiente (características físicas, químicas e biológicas), os fatores associados às plantas, principalmente aqueles relacionados à composição dos exsudados e estrutura radicular e os fatores inerentes à bactéria, como resposta quimiotática, rizocompetência e utilização de substratos orgânicos.

Possivelmente as diferenças encontradas neste trabalho em relação aos estudos de diversidade de *A. amazonense*, podem ser indicados como fatores de influência nas taxas de FBN associadas a essas plantas.

Conclusões

As análises de agrupamento realizadas com os resultados da técnica de ELISA e a utilização de fontes de carbono do sistema BIOLOG mostram importante diversidade intra-específica dos isolados de *A. amazonense*.

Os resultados apontam para possíveis efeitos dos tipos de solo/ambiente e espécie de *Brachiaria* sobre essa diversidade.

Referências Bibliográficas

ANNAPURNA, K.; GAUR, Y. D. Serological reactivity of *Azospirillum* brasilense. **Indian Journal of Experimental Biology**, London, v. 28, p. 1050-1053, 1990.

ASANUMA, S.; THOTTAPPILLY, G.; AYANABA, A.; RANGA RAO, V. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of *Rhizobium* both in culture and from nodules of soybeans and cowpea. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, n. 6, p. 524-528, 1985.

BAGWELL, C. E.; PICENO, Y. M.; ASHBURNE-LUCAS, A.; LOVELL, C. R. Physiological diversity of the rhizosphere diazotroph assemblages of selected salt marsh grasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4276-4282, 1998.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz.** 1984. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1984.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; PUENT, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; HOLGUIN, G.; TOLEDO, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Soil parameters which affect survival of *Azospirillum brasilense*. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Ed.). ***Azospirillum VI and related microorganisms***: genetics, physiology, ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995a. p. 441-449.

BASHAN, Y.; PUENT, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* Cd and Sp-245 in the rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1938-1045, 1995b.

BERNARDS, A. T.; DIJKSHOORN, L.; VAN DER TORN, J.; BOCHNER, B. R.; VAN BOVEN, C. P. Phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridization groups by means of Biolog system. **Journal of Medical Microbiology**, Harlow, v. 42, p. 113-119, 1995.

BIOLOG. **GN2 Microplate™** : instructions for use (for in vitro diagnostic use only). Hayward, 1999. 8 p.

Boddey, R. M.; Victoria, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, The Hague, v. 90, p. 256-292, 1986.

BUSSABE, W. O.; MIAZAKI, É. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 9., 1990, São Paulo, SP. **Resumos...** São Paulo: USP: IME, 1990.

CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**, New York, v, 81, p. 1-19, 1989.

DAVIES, R. L.; QUIRIE, M. Intra-specific diversity within *Pasteurella trehalosi* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. **Microbiology**, London, v. 142, p. 551-560, 1996.

DE-POLLI, H.; BOHLOOL, B. B.; DÖBEREINER, J. Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups.

Archives of Microbiology, Springer, v. 126, p. 217-222, 1980.

ENGVAL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 109, p. 129-135, 1972.

ENGVAL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Leiden, v. 8, p. 871-874, 1971.

FUHRMANN, J.; WOLLUN II, A. G. Simplified enzyme-linked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1010-1013, 1985.

GRAY, T. R. G.; MANSOOR, E. Y. The application of serological techniques to the taxonomy of *Arthrobacter* and related organisms. **Microbiology**, London, v. 142, p. 561-563, 1996.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369-378, 1998.

HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum: plant associations**. Rehovot: CRC, 1994. p.15-39.

HILDEBRAND, D. C.; HENDSON, M.; SCHROTH, M. N. Usefulness of nutritional screening for the identification of *Xanthomonas campestris* DNA homology groups and pathovars. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 75, p. 447-455, 1993.

HUBÁLEK, Z. Numerical comparative serology – the methods. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 52, p. 307-318, 1982.

KISHINEVSKY, B. D.; GURFEL, D.; BRONKERD, N.; NEMAS, C. Serological grouping of indigenous *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*) isolated from various soils of Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, p. 635-640, 1993.

KLINGER, J. M.; STOWE, R. P.; OBENHUBER, D. C.; GROVES, T. O.; MISHRA, S. K.; PIERSON, D. L. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2089-2092, 1992.

KONOPKA, A.; OLIVIER, L.; TURCO JR., R. F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 103-115, 1998.

Loureiro, M. F.; Boddey, R. M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 1343-1353, 1988.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

OLIVEIRA, O. C.; OLIVEIRA, I. P.; FERREIRA, E.; ALVES, B. J. R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C. H. B.; VILELA, L. BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. **Anais...** Viçosa: SOBRADE: UFV, 1997. p. 110-117.

REIS, V. M. **Estudos de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar.** 194 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A. C.; REIS JÚNIOR, 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. 11 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 30).

RIBEIRO, J. R. A. **Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. isolados de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), originários da região nordeste brasileira.** 1999. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.12, p.16, 1986.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System.** New York: State University of New York, 1994.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia.** São Paulo: Manole, 1999. 423 p.

ROSS, I. L.; YOUNES, A.; HARVEY, P. R.; ACHOUAK, W.; RYDER, M. H. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related Pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1609-1616, 2000.

SAMPAIO, M. J. A.; VASCONCELOS, L. de; DÖBEREINER, J. Characterization of three groups within *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Ecological bulletin**, Washington, v. 26, p. 364-365, 1978.

SCHLOTER, M.; KIRCHOF, G.; HEINZMANN, U., DÖBEREINER, J.; HATMANN, A. Immunological studies of the wheat root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains SP7 and SP245 using strain specific monoclonal antibodies. In: HEGAZI, N. A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (Ed.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: American University of Cairo, 1994. p. 291-297.

SCHLOTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnology Advanced**, v.13, p. 75-90, 1995.

SCHLOTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v. 24, p. 647-660, 2000.

SILVA, L. G. **Estudos de colonização em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) por *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. utilizando técnicas imunológicas**. 1999. 147 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. **Principles of numerical taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman, 1963. 359 p.

SOUTO, S. M. **Variação estacional da fixação de N₂ e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais**. 1982. 268 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1982.

TOTH, I. K.; BERTHEAU, Y.; HYMAN, L. J.; LAPLAZE, L.; LÓPEZ, M. M.; McNICOL, J.; NIEPOLD, J.; PERSSON, P.; SALMOND, G. P. C.; SLETTEN, A.; van der WOLF, J. M.; PÉROMBELON, M. C. M. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. Atroseptica. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 87, p. 770-781, 1999.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: A PLANTA FORRAGEIRA NO SISTEMA DE PRODUÇÃO, 17., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164 p.

YOHALEM, D. S.; LORBEER, J. W. Intraspecific metabolic diversity among strains of *Burkholderia cepacia* isolated from decayed onions, soils, and the clinical environment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 65, p. 111-131, 1994.

Utilisation of ELISA and BIOLOG techniques for intra-specific diversity studies with *Azospirillum amazonense* strains isolated from different *Brachiaria* species

Abstract – *The limitation of nitrogen is considered one of the most important factors influencing the Brazilian pastures degradation. However there are evidences that pastures formed by some species of the Brachiaria genus could be benefited by the biological nitrogen fixation (BNF), guaranteeing a higher longevity to these pastures. Previous studies showed that the diazotrophic bacteria found in association with these forage grasses were mainly from the Azospirillum amazonense species. Since associations between these microorganisms and plants are generally conditioned by the vegetation, it is possible that different Brachiaria genotypes can exercise a selective effect on the Azospirillum populations. The aim of this work was to study the intra-specific diversity of A. amazonense isolates and to establish possible influences of different Brachiaria species and edaphoclimatic conditions. The characterisation of the diversity among these isolates was conducted using serological tests (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and tests of carbon sources metabolism (BIOLOG™). These methods were capable to show important information regarding the diversity among the studies isolates of A. amazonense.*

Index terms: Biological nitrogen fixation, grasses, pastures.