

**Produção e Caracterização de Anticorpos Policlonais  
contra Bactérias Fixadoras de Nitrogênio dos Gêneros  
*Gluconacetobacter* spp. e *Herbaspirillum* spp.**



**República Federativa do Brasil**

*Fernando Henrique Cardoso*  
Presidente

**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

*Marcus Vinícius Pratini de Moraes*  
Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa***

**Conselho de Administração**

*Márcio Fontes de Almeida*  
Presidente

*Alberto Duque Portugal*  
Vice-Presidente

*Dietrich Gerhard Quast*  
*José Honório Accarini*  
*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Alberto Duque Portugal*  
Diretor Presidente

*Bonifácio Hideyuki Nakasu*  
*Dante Daniel Giacomelli Scolari*  
*José Roberto Rodrigues Peres*  
Diretores Executivos

**Embrapa Agrobiologia**

*Maria Cristina Prata Neves*  
Chefe Geral

*José Ivo Baldani*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Geraldo Baêta da Cruz*  
Chefe Adjunto Administrativo

Completar para 100 mL de PBS diluído 1:10 em água estéril.

Solução de Lavagem 0,5 g leite em pó desnatado

50 µl de tween 20

Completar para 100 mL de PBS diluído 1:10 em água estéril.

Solução de coloração

Dissolver 1,67 gr. de Tampão ABTS (Buffer Mix Boehringer: perborato de sódio + ácido cítrico + fosfato de hidrogênio di-sódio) em 10 mL de água destilada. Manter no freezer.

Para uso, (solução de 10 mL)

1 mL de tampão ABTS

9 mL de água estéril

10 mg mL de ABTS

### **Soluções para Purificação**

Tampão de Ligação  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH7, 20 mM

57,7 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 42,3 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , de solução estoque de 0,1 M, diluir 5 vezes (10mL de solução + 40mL e água estéril), obtendo solução 20mM.

Tampão Ácido Cítrico, pH3, 0,1 M

Tris HCl, pH9, 1,0M



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISSN 1517-8498

Outubro/2002

## **Documentos 149**

**Produção e Caracterização de Antissoros Policlonais contra Bactérias Fixadoras de Nitrogênio dos Gêneros *Gluconacetobacter* spp. e *Herbaspirillum* spp.**

Liamara Perin  
Edmilson Evangelista da Silva  
Verônica Massena Reis

*Seropédica – RJ*

2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

### Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 47

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: José Ivo Baldani (Presidente)  
José Antônio Ramos Pereira  
Marcelo Grandi Teixeira  
Robert Michael Boddey  
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero  
Verônica Massena Reis  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Kátia Regina dos Santos Teixeira

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2002): 50 exemplares

PERIN, L.; SILVA, E. E. da; REIS, V.M. **Produção e Caracterização de Antissoros Policlonais contra Bactérias Fixadoras de Nitrogênio dos Gêneros *Gluconacetobacter* spp. e *Herbaspirillum* spp.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, out. 2002. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 149).

ISSN 1517-8498

1. Anticorpo. 2. *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 3. *Herbaspirillum* spp.  
I. Silva, E.E. da, colab. II. Reis, V. M., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 571.967

© Embrapa 2002

### Protocolo para Purificação dos soros utilizando proteína A

- 1 Lavar a coluna 10X com 1 mL de Tampão de Ligação 20mM pH 7;
- 2 Aplicar 10 mL do anticorpo diluído 1:50 (200 µl de soro mais 9.800 µl de Tampão de Ligação);
- 3 Lavar a coluna 3X com 1 mL de Tampão de Ligação;
- 4 Aplicar 3X 1 mL de Ácido cítrico 1M pH3;
- 5 Coletar o eluente da coluna em frascos de vidro;
- 6 Aplicar 5X 1 mL de etanol 20%;
- 7 Adicionar aos frascos contendo o antissoro purificado 500 µl de Tris-HCl (1 M; pH 9) para aumentar o pH.

Utilização de coluna HI-TRAP da BIORAD

### Soluções para o teste de ELISA

Tampão fosfato salino (PBS) pH7,2:

8g NaCl

0,22g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,19g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Completar o volume para 1 litro com H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Tampão carbonato, pH 9,6

50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

50mM NaHCO<sub>3</sub>

Solução de bloqueio

3 g de leite em pó

*Herbaspirillum* spp. utilizando técnicas imunológicas. 1999. 152 f. Tese (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍRES, L. E.. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 45-55, 2000.

YAMADA, Y.; HOSHICO, K.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter corrig.* (*Gluconacetobacter* (sic)). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List No. 64. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 48, p. 327-328, 1998.

## 5. Apêndice

---

### Protocolo do ELISA

1. 50 µl de antígeno, incubar por 18 horas;
2. Lavar uma vez com 200 µl de solução de lavagem;
3. Solução de bloqueio, 100 µl, incubar a 37°C por 30 min;
4. Anticorpo 1<sup>o</sup> (anti-soro), 50 µl, incubar a 37°C por 30 min;
5. Solução de lavagem 200 µl, 3 vezes;
6. Anticorpo 2<sup>o</sup> (conjugado), 50 µl, incubar a 37°C por 45 min;
7. Solução de lavagem 200 µl, 5 vezes;
8. Substrato 100 µl, incubar por 10 a 20 min;
9. Leitura a 405 nm;

Obs: os volumes citados são para cada poço da micro placa.

## Autores

### Liamara Perin

Estudante de mestrado, Dept. de Solos, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

### Edmilson Evangelista da Silva

Estudante de agronomia da UFRRJ, bolsista PIBIC/CNPq

### Verônica Massena Reis

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia – Laboratório de Eco Fisiologia Aplicada

PAULA, M. A.; URQUIAGA, S.; SIQUEIRA, J. O.; DÖBEREINER, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 14, p. 61-66, 1992.

REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade do gênero *Herbaspirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS, V. M.; CRUZ, G. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A. C.; REIS JUNIOR, F. B.; RIBEIRO, J. R. A.; SALLES, J. F.; WEBER, O. B. **Produção e caracterização de soros policlonais para detecção de bactérias diazotróficas.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 9 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30).

RIBEIRO, J. R. A. Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. isolados de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) originários da região nordeste brasileira. 1999. 117 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

SCHLOTTER, M.; MOENS, S.; CROES, C.; REIDEL, R.; ESQUENET, M.; DEMONT, 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.

SILVA, L. G. Estudos de colonização em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) por *Acetobacter diazotrophicus* e

host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

LENZ, G. **Métodos imunológicos**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofis/metimuno.pdf>>. Acesso em julho de 2002.

LI, R.; MACRAE, I. C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 413-419, 1992.

LOGANATHAN, P.; SUNITA, R.; PARIDA, A. K.; NAIR, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Gluconacetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 87, p. 167-172, 1999.

LOMMEL, S. A.; MCCAIN, A. H.; MORRIS, T. J. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viroses. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p. 1028-1022, 1982.

OLIVARES, F. L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. 1997. 328 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

OLSEN, P. E.; RICE, W. A.; STEMKE, G. W.; PAGE, W. J. Strains-specific serological techniques for the identification of *Rhizobium meliloti* in commercial alfafa inoculants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 520-522, 1983.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoque ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso de adubação verde e de controle biológico de pragas, bem como no emprego eficiente dos recursos naturais. Infere-se daí que os processos biológicos que ocorrem no sistema solo/planta, efetivados por microrganismos e pequenos invertebrados, constituem a base sobre a qual a agricultura agroecológica se sustenta.

O documento 149/2002 faz parte do esforço no sentido de desenvolver ferramentas auxiliares para o estudo das bactérias diazotróficas endofíticas responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	07
2- MATERIAL E MÉTODOS .....	09
2.1- Produção de Anticorpos Policlonais .....	09
Antígeno .....	09
Preparo do inóculo bacteriano .....	10
Imunizações e Sangrias.....	10
Coleta de Amostras.....	12
Teste de Imunoabsorção com Enzima Acoplada (ELISA) .....	13
2.2- Caracterização dos Anticorpos.....	14
Verificação da produção de anticorpos e determinação da curva de diluição .....	14
Determinação da especificidade .....	15
Purificação dos anticorpos.....	15
Teste de sensibilidade.....	17
3- RESULTADOS.....	17
3.1- Procedimentos a serem adotados durante o período de imunizações .....	17
3.2- Verificação da produção de anticorpos e curva de diluição.....	18
Gênero <i>Herbaspirillum</i> spp .....	19
Gênero <i>Gluconacetobacter</i> spp .....	22
3.3- Determinação da Especificidade.....	25
Gênero <i>Herbaspirillum</i> spp .....	25
Gênero <i>Gluconacetobacter</i> spp .....	29
3.4- Purificação por cromatografia de afinidade.....	31
3.5 - Teste de sensibilidade.....	33
4 - BIBLIOGRAFIA.....	34
5 - APÊNDICE.....	37

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 402-408, 1986.

CABALLERO-MALLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; REIS, V. M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3008-3013, 1995.

CABALLERO-MALLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1532-1537, 1995.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

DOBEREINER, J.; REIS, V. M.; LAZARINI, A. C. New N<sub>2</sub> fixing bacteria in association with cereal and sugarcane. In: BOTHE, H.; DE BRUIJHN, F. J.; NEWTON, W. E., (Eds.). **Nitrogen fixation: hundred years after**, Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 717-722.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Elmsford, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNANDES, A.; JIMENEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1305-1314, 2001.

JIMENES-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new

# Produção e Caracterização de Antissoros Policlonais contra Bactérias Fixadoras de Nitrogênio dos Gêneros *Gluconacetobacter* spp e *Herbaspirillum* spp

Liamara Perin  
Edmilson Evangelista da Silva  
Verônica Massena Reis

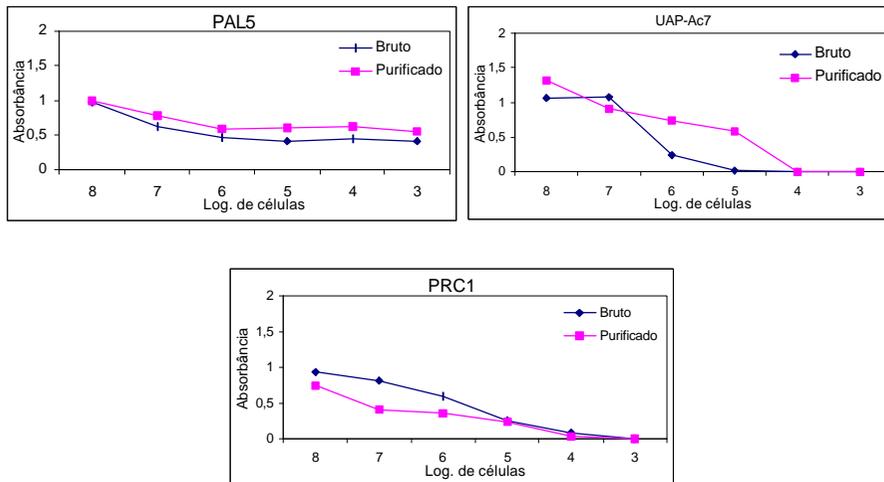


Figura 18: Determinação do nível mínimo de detecção dos anticorpos policlonais produzidos contra antígenos do gênero *Gluconacetobacter* spp.. Diluição dos anticorpos brutos 1:500 para PAL5, PRC1 e CFN-cf55 e 1:1000 para UAP-Ca97. Anticorpos purificados em coluna com proteína A, diluídos 1:10.

## 4. Bibliografia

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisulbalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BARRAQUIO, W. L.; LADHA, J. K.; YAO, H. Q.; WATANABE, I. Antigenic relationship of N<sub>2</sub>-fixing *Pseudomonas* strain H8 to various known cultures and rice rhizosphere isolates studied by indirect

## 1. Introdução

Anticorpos são produzidos pelos linfócitos B a partir de células que se originam na medula óssea, sendo distribuídos pelo organismo inteiro pelo sistema linfático. Quando um antígeno ingressa em um organismo, o linfócito, (no caso da produção de soros monoclonais), ou os linfócitos (referente a produção de soros policlonais) que tiverem o receptor para este antígeno, se reproduzem e se diferenciam, voltando toda a sua atividade para a produção de anticorpos. Portanto um certo período após o antígeno ter entrado em contato com o organismo, inicia-se a produção do anticorpo específico para este organismo estranho, inativando-o.

A indução da produção de anticorpos levou ao uso de métodos imunológicos aplicados nas mais diversas áreas de conhecimento e constituiu-se numa ferramenta poderosa para o estudo de ecologia e diversidade de microrganismos do ambiente (Schloter *et al.*, 1994; 1995). Estes métodos apresentam resultados rápidos, grande especificidade e sensibilidade além da maleabilidade de uso (Lenz, 1997). Sua sensibilidade em detectar baixas concentrações do organismo em questão é comparável à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) que é capaz de amplificar em escala logarítmica uma única cópia de uma molécula de DNA (Schloter *et al.*, 1995).

Inúmeras técnicas imunológicas são utilizadas para a detecção da interação entre antígeno-anticorpo. Dentre elas, a técnica de ELISA (ensaio de imuno-adsorção com enzima acoplada), introduzida por Engvall & Perlmann (1971), tem sido a mais utilizada em trabalhos de ecologia microbiana, para a detecção de viroses (Lommel *et al.*, 1982) e rizóbio (Olsen & Rice, 1983; Ribeiro, 1999). Já seu emprego no estudo de bactérias diazotróficas é escasso (Barraquio *et al.*, 1986; Li & Macrae, 1992). Recentemente (Silva, 1999), utilizou a técnica de ELISA indireta, no estudo da colonização de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar e Reis Júnior (2002) no estudo da diversidade destes microrganismos colonizando espécies de *Brachiaria*.

Esta técnica está baseada na visualização da reação antígeno-anticorpo, através de uma reação colorimétrica. Podendo ser indireta, onde o antígeno é preso a uma superfície, geralmente poliestireno, e reconhecido por anticorpos, ou direta, onde o antígeno é preso entre 2 camadas de anticorpo. Depois da formação do complexo antígeno-anticorpo, este é reconhecido por outro anticorpo ligado a uma enzima que produz um composto detectável, colorimétrico, mensurável através da leitura da densidade ótica.

Para a aplicação dos anticorpos produzidos em técnicas imunológicas, eles precisam atender os requisitos de poder de detecção e especificidade. Portanto o presente trabalho teve o objetivo de produzir e caracterizar antissoros policlonais contra isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp., para aplicação no laboratório de Ecofisiologia Aplicada da Embrapa Agrobiologia em estudos tais como: detecção, quantificação, localização e diversidade destes microrganismos de amostras ambientais ou já isolados, através do uso de inúmeros métodos imunológicos descritos na literatura (Reis *et al.*, 1997).

### 3.5- Teste de Sensibilidade

Os resultados demonstraram que foram necessários em torno de  $10^6$  células por mL para um detecção positiva tanto para os antissoros brutos como purificados (figura 17 e 18). Estes resultados ficaram de acordo com a literatura, com exceção do antissoro IR509 onde verificou-se uma queda brusca na sensibilidade de detecção tanto para o soro bruto como para o purificado. Os valores altos de absorbância demonstrados pelos antissoros HA20 e 74 e CFN-cf55, quando brutos, pode ser devido às reações inespecíficas que apresentaram no teste de reação cruzada, que foram eliminadas no processo de purificação.

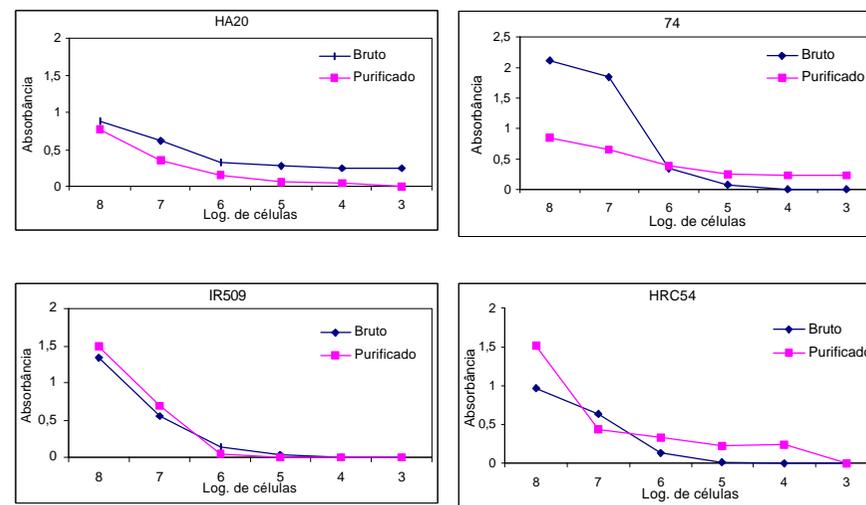


Figura 17: Determinação do nível mínimo de detecção dos anticorpos policlonais produzidos contra antígenos do gênero *Herbaspirillum* spp.. Diluição dos anticorpos brutos 1:500 para HA20 e 74 e 1:1000 para IR509 e HRC54. Anticorpos purificados em coluna com proteína A, diluídos 1:10.

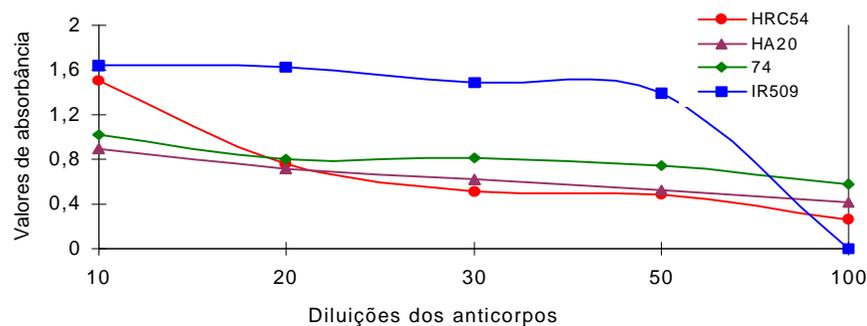


Figura 15: Valores de absorvância (405 nm) dos anticorpos purificados em colunas contendo proteína A, produzidos contra as estirpes do gênero *Herbaspirillum* spp.

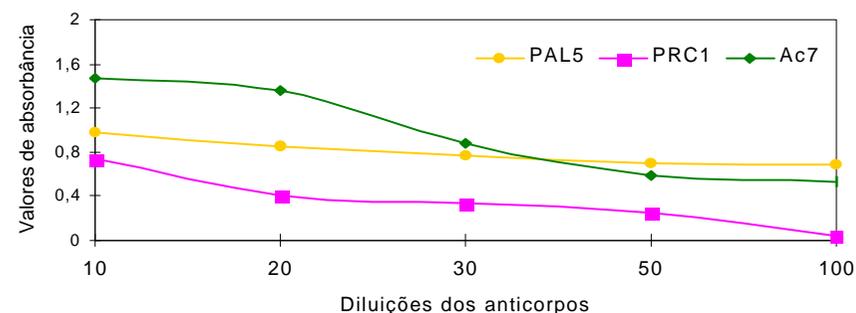


Figura 16: Valores de absorvância (405 nm) dos anticorpos purificados em colunas contendo proteína A, produzidos contra as estirpes do gênero *Gluconacetobacter* spp.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Produção de Anticorpos Policlonais

#### Antígeno

O primeiro passo para a produção de anticorpos é a purificação e caracterização do antígeno. Os antígenos selecionados foram bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes culturas pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter* spp. (Tabela 1).

Da espécie *G. diazotrophicus*, foram produzidos antissoros contra as estirpes PAL5, PRC1 e UAP-Ac7, isoladas das culturas de cana-de-açúcar, *Pennisetum purpureum* e abacaxi, respectivamente. Mais 4 antissoros foram produzidos contra 1 estirpe e 3 isolados do gênero *Herbaspirillum*. A estirpe utilizada foi HRC54 da espécie *H. seropedicae*, isolada de raízes de cana-de-açúcar. Também foi produzido antissoro contra o isolado 74B da espécie *H. frisingense*, obtido de *Pennisetum purpureum* e mais 2 isolados de arroz escolhidos a partir do comportamento apresentado em testes de fontes de carbono, onde cresceram na presença de meso-eritritol acrescido de nitrogênio, fonte discriminatória para a classificação dentro da espécie *H. rubrisubalbicans*. Vale ressaltar que esta espécie, até o momento, só foi detectada colonizando plantas de cana-de-açúcar.

Tabela 1: Relação e características das estirpes utilizadas como antígenos na produção de anticorpos

Estirpe	Espécie	Hospedeiro	Origem	Parte da planta
<i>Gluconacetobacter</i>				
PAL5	<i>G. diazotrophicus</i>	Cana-de-açúcar	Brasil	Raízes
PRC1	<i>G. diazotrophicus</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>	Brasil	Raízes
UAP-Ac7	<i>G. diazotrophicus</i>	Abacaxi	México	Pseudo caule
<i>Herbaspirillum</i>				
HRC54	<i>H. seropedicae</i>	Cana-de-açúcar	Brasil	Raízes
HA20	<i>Herbaspirillum</i> spp.	Arroz, var. MGI		Raízes
IR509	<i>Herbaspirillum</i> spp.	Arroz, var. IR	Filipinas	-
74 B	<i>H. frisingense</i>	<i>Pennisetum purpureum</i>		

### *Preparo do Inóculo Bacteriano*

Todas as bactérias foram crescidas por 24 horas em 50 mL de meio de cultura líquido SYP (Caballero-Mellado e Martinez-Romero, 1994), sem corante, sob agitação a 30°C. Toda a suspensão bacteriana foi colocada em tubos próprios para centrifuga, calibrados e centrifugados a 5000 g durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em água destilada estéril. Este procedimento foi repetido por 3 vezes ou até que todo o meio de cultura fosse eliminado, permanecendo o sobrenadante transparente. Após a eliminação do meio de cultura e do muco solúvel na fase líquida, o pellet que contém apenas as células, foi ressuscitado em 2 mL de água destilada estéril e aquecido a 90°C por 30 minutos em banho-maria para promover a morte celular e inativação das proteínas do flagelo. Após esse tratamento, 1mL da suspensão foi estocada em frasco limpo e estéril na geladeira para posterior uso e ao outro mL foi misturado a 0,5 mL de adjuvante completo de Freud's e 0,5 mL de adjuvante incompleto de Freud, que ativam o sistema imunológico. Para a completa homogeneização, esta mistura permaneceu por uma noite em frascos sob agitação constante. Para imunizações posteriores as bactérias foram novamente crescidas em meio de cultura líquido, tendo sempre o cuidado de seguir o procedimento descrito acima, ressuscitadas em 2 mL de água e armazenadas em geladeira. No momento da imunização foi retirado 1 mL com seringa, sempre observando possível aparecimento de contaminantes, e aplicou-se nos coelhos.

Para evitar alterações no metabolismo celular por possíveis mudanças no procedimento de preparo de inóculo, recomenda-se, que os antígenos sejam crescidos numa maior quantidade de meio de cultura (200 mL), para que a quantidade de células obtidas seja suficiente para todas as inoculações.

### *Imunizações e Sangrias*

Os animais escolhidos, foram coelhos da raça Nova Zelândia, com 2 meses de idade. Para cada antissoro deve-se usar mais de um animal e estes devem ser avaliados separadamente. Antes de iniciar

### **3.4- Purificação por Cromatografia de Afinidade**

Observa-se nas figuras de 8 a 14, que após purificado, os anticorpos tenderam a diminuir as reações inespecíficas e aumentar os valores de reação com estirpes da própria espécie.

A purificação dos antissoros contra as estirpes e isolados do gênero *Herbaspirillum*, em colunas com proteína A, foi considerada eficiente na eliminação de imunoglobulinas inespecíficas. Geralmente após a purificação houve aumento das percentagens de reação dos antissoros com estirpes da própria espécie e diminuição quando com estirpes de outra espécies. Não houve diminuição dos valores de reação cruzada de estirpes de outras espécies com o antissoro 74, porém como comentado anteriormente, o baixo aumento de resposta imunogênica durante a imunização implicou em menor especificidade.

Já com os soros produzidos contra estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, houve diminuição dos valores de reação cruzada, até mesmo entre as estirpes da mesma espécie.

Nova curva de titulação foi obtida com os antissoros purificados (figuras 15 e 16), para determinar a melhor diluição a ser usada quando purificados. Estas curvas apresentaram comportamentos diferentes, como já verificado na curva de titulação dos antissoros brutos, pois cada animal e antígenos reagem de maneira diferente.

Recomenda-se que a purificação por afinidade seja feita no momento da utilização do soro e em quantidades pequenas pois a armazenagem implica na perda de reação.

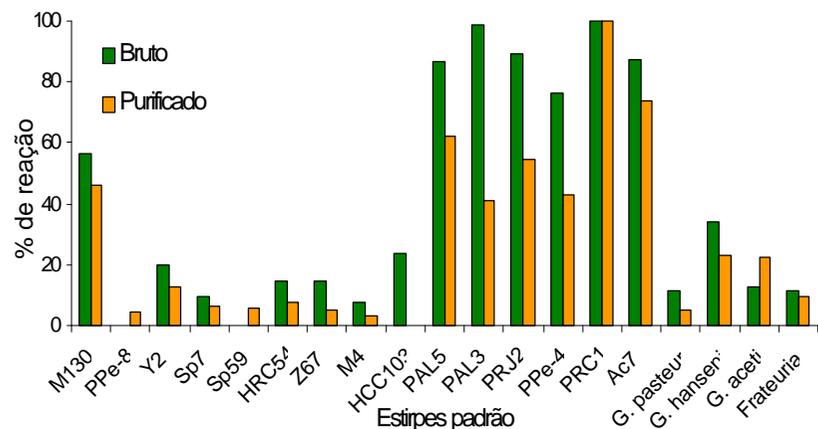


Figura 13: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados contra a estirpe PRC1 de *G. diazotrophicus*

as imunizações, foi coletado de 5 a 10 mL de sangue da veia marginal da orelha. Esta amostra denominou-se pré-mune sendo necessária para certificar de que o animal não estava com seu sistema imunológico ativo contra algum organismo estranho. Quando o animal apresenta alta produção de anticorpos, detectado pela técnica de ELISA, contra o antígeno alvo, ele deve ser descartado, pois implicará em inespecificidade, isto é, os anticorpos produzidos contra o antígeno desejado, irão reagir com ele e com a maioria dos organismos testados, por apresentarem epitopos (molécula com capacidade antigênica) em comum.

No mesmo dia, após a coleta do sangue da orelha, o animal recebeu a primeira imunização. Foi injetado sob a pele, no dorso do animal em 8 a 10 pontos diferentes, os 2 mL de suspensão bacteriana acrescidas de adjuvante completo e incompleto de Freud's. As inoculações seguintes foram apenas com 1 mL de suspensão bacteriana, inoculada no músculo da pata traseira do coelho em intervalos de 7 dias. Foi escolhido um dia da semana para iniciar este trabalho, de acordo com o cronograma apresentado na Tabela 2, evitando assim confusões e esquecimento.

Tabela 2: Cronograma para a produção de anticorpos compreendendo, inoculação, coleta de sangue e sangria

Tempo (semanas)	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
Imunizações	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta de sangue	X			X			X	
Sangria								X

Na quarta semana, já com os resultados do pré-imune mostrando que o animal está apto para a produção do soro, coletar uma nova amostragem de 5 a 10 mL de sangue da veia marginal da orelha, para verificar se estava ocorrendo produção de anticorpos específicos.

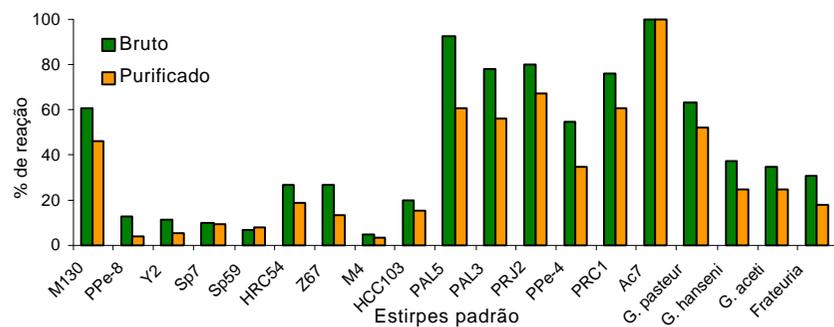


Figura 14: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados contra a estirpe UAP-Ac7 de *G. diazotrophicus*

Se a amostragem de pré-imune apresentou baixa reatividade contra o antígeno alvo e esta aumentou com imunizações posteriores, pode-se dar continuidade às imunizações. Segundo Reis (1997), oito inoculações são suficientes para um bom estímulo do sistema imunológico. Portanto, na sétima semana, antes de imunizar o animal, foi realizada nova amostragem da veia da orelha. Após testar e verificar boa produção de anticorpos (densidade ótica a 405 nm utilizando a técnica de ELISA indireta, os valores devem estar iguais ou superiores a 0,6 usando o soro diluído 1:1000), o animal foi sangrado por punção cardíaca 5 dias depois da última imunização, período em que há maior produção de anticorpos específicos. Neste momento, foi retirado de 50 a 70 mL de sangue. Se os valores não forem satisfatórios, deve-se continuar imunizando o animal até obtê-los.

#### Coleta de Amostras

O sangue foi coletado e manuseado com cuidado (evitar balançar) para evitar hemólise. Posteriormente, foi levado para o laboratório onde permaneceu em repouso no sentido horizontal a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas para coagular e permitir a separação do coágulo sangüíneo do soro. Depois de coagular, o êmbolo da seringa foi puxado até o final e a seringa foi inclinada para melhor separação. Após a separação, o soro contendo os anticorpos foi transferido da seringa para tubos e centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4°C para melhor separação das hemáceas. A seguir o soro foi aquecido a 56°C por 1h para diminuir a concentração dos componentes que possam causar reações inespecíficas. Finalmente o soro foi dividido em alíquotas de 1 mL e acondicionado em frascos de vidro, com capacidade de 2 mL e estocados em freezer para posteriores ensaios. A estocagem em pequenas quantidades é importante para evitar sucessivos descongelamentos que provocarão perda da qualidade do anticorpos. Tanto a estocagem como em todos os ensaios, foi utilizado frascos de vidro, por possuírem cargas neutras, não provocando aderência dos anticorpos na sua superfície.

#### Gênero *Gluconacetobacter spp.*

Os soros produzidos contra estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentaram reações cruzadas e variações entre as estirpes da mesma espécie. Os soros produzidos podem ser caracterizados como espécie específicos sendo no caso do soro da estirpe PAL-5 só não reconhece na mesma magnitude a estirpe PRC 1, isolada de *Pennicetum purpureum* porém esta estirpe pertence ao ET7, mais distante grupo eletroforético, quando avaliada por MLEE-uso de enzimas comuns do metabolismo microbiano (Caballero-Mellado, 1995). Já o soro da estirpe PRC 1 (Figura 13) tem em torno de 50% de reação cruzada com a estirpe M 130 pertencente a espécie *Burkholderia brasilensis*. Este comportamento já havia sido observado por Silva (1999), durante a caracterização de soros produzidos contra as estirpes PAL3 e PRJ2.

O antissoro UAP-Ac7 (Figura 14), reagiu acima de 50% para todos os isolados de *G. diazotrophicus* incluindo a espécie não fixadora *G. pasteurianus*. Também foi observada reação acima de 40% com a estirpe M 130.

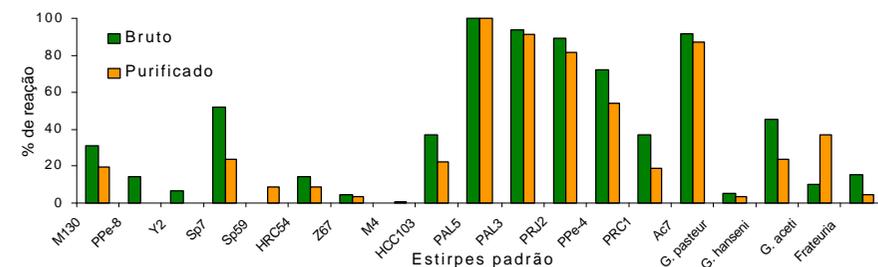


Figura 12: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados contra a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

O antissoro HA20 (Figura 11) reconheceu os isolados do mesmo gênero pertencentes a *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC 103) e *Herbaspirillum frizinguense* (74, 84 b) e *Herbaspirillum* spp. (IR 509). Podendo ser usado na diferenciação entre *H. seropedicae* das outras espécies. A exceção foi a alta reação do antissoro purificado com o isolado HRC 54.

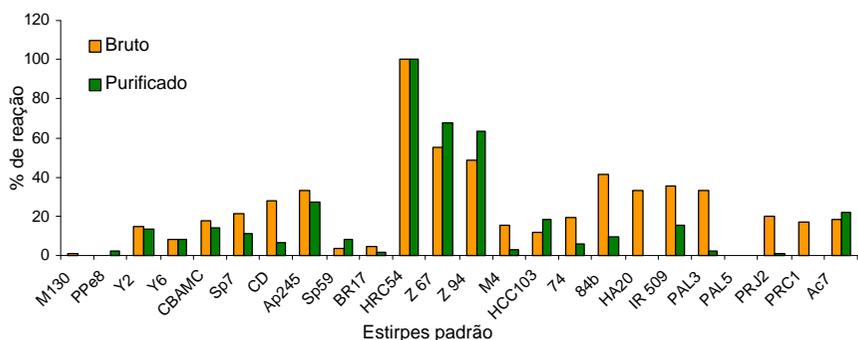


Figura 10: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados coluna contendo proteína A, contra a estirpe HRC54 de *H. seropedicae*

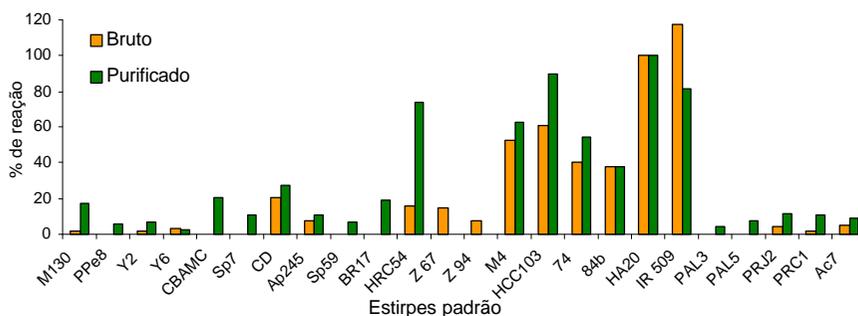


Figura 11: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados coluna contendo proteína A, contra a estirpe HA20 de *Herbaspirillum* spp.

### Teste de Imunoadsorção com Enzima Acoplada (ELISA)

Utilizou-se a técnica de ELISA indireta em todos os ensaios de caracterização dos anticorpos produzidos, seguindo o protocolo desenvolvido por Reis (1997). Para a utilização desta técnica, as bactérias utilizadas na inoculação foram crescidas em meio sólido SYP (para *Gluconacetobacter* spp.) e NFb com 3 vezes a quantidade do indicador (para *Herbaspirillum* spp.). Quando puras, todas as estirpes foram crescidas em meio líquido SYP por 24 horas sob agitação constante. Recomenda-se que todas as estirpes sejam crescidas cultura líquida do mesmo meio para inoculação.

O preparo da placa é a fase mais importante de todo ensaio de ELISA e deve ser planejada usando um modelo da mesma desenhado em papel como se fosse uma planilha referente ao ensaio, que deve conter além das amostras a serem analisadas, o controle positivo, que será a bactéria que deu origem ao antissoro e controles negativos. Como controles negativos foram utilizados o pré-imune na quarta repetição de cada amostra e mais 2 repetições sem adição da bactéria, 2 repetições sem adição do anticorpo primário e 2 repetições sem adição do anticorpo secundário.

Após 24 horas as células foram centrifugadas a 7000 g por 5 min., ressuspendidas em tampão carbonato-bicarbonato (Apêndice 1). A densidade ótica a 436 nm foi ajustada para 0,8 para *Gluconacetobacter* spp. e 1,0 para *Herbaspirillum* spp., correspondendo a  $10^8$  ufc/mL (Silva 1999). Após o ajuste da densidade ótica, colocou-se 50 µl da suspensão por poço da placa de ELISA com 4 repetições. Após a distribuição das amostras nas placas, estas foram incubadas para impregnar por 18 horas a 4°C (incubar durante a noite). Recomenda-se não utilizar os poços limítrofes da placa (colunas A e H, linha 1 e 12) e separar uma amostra da outra por uma linha de poços. Ao fim da impregnação, as placas contendo as amostras foram lavadas uma vez com 200 µl de solução de lavagem (tampão PBS diluído 1:10 em água + 0,05% Tween 20 + 0,5%BSA), estando prontas para a próxima etapa, que foi o teste ELISA indireto.

Após esse período adicionou-se 100  $\mu$ L/poço da solução de bloqueio (leite em pó 3% em PBS diluído 1:10 em água) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Este procedimento evita a ligação inespecífica dos anticorpos na superfície da placa. A solução de bloqueio foi retirada e 50  $\mu$ l do anticorpo primário foi distribuído em cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e a seguir, o excesso do anticorpo foi retirado e a placa lavada 3 vezes com 200  $\mu$ l/poço da solução de lavagem. Após a lavagem foram colocados 50  $\mu$ L/poço do anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase), diluído 1:1000 e a placa incubada a 37°C por 45 minutos. O conjugado restante foi retirado e a placa lavada 5 vezes com 200  $\mu$ L da solução de lavagem por poço. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução contendo o substrato para a enzima peroxidase [a partir de solução estoque de tampão ABTS (1,67 g de tampão ABTS em 10 mL de água estéril), diluído 1:10 em água estéril + 1 mg.mL e ABTS], foram adicionados a cada poço e a reação foi mantida por 15 a 20 minutos sob agitação de 100 rpm, utilizando o agitador de placas de ELISA, a temperatura ambiente. Após esse período foi realizada a leitura da placa a 405 nm, em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus, especial para leitura da microplaca, acoplado a um computador pessoal 486 com o programa Labsystem Transmit Multiskan Plus para Windows. Desta leitura de absorbância das amostras, foi calculado a média das 3 repetições e subtraído os valores obtidos com o soro pré-imune (controle negativo da reação). Este procedimento não foi adotado quando a variável testada foi o próprio pré-imune, de amostragens extraídas antes de iniciar as imunizações. Importante ressaltar que a leitura do controle negativo – o pré-imune, também é feito com 4 repetições.

## 2.2 Caracterização dos Anticorpos

### Verificação da Produção de Anticorpos e Determinação da Curva de Diluição

Foi avaliado o aumento da densidade ótica das amostras de sangue coletadas dos animais inoculados, retiradas antes da primeira

comunicação pessoal), indicando que dentre eles, apenas alguns são semelhantes ao padrão HRC54.

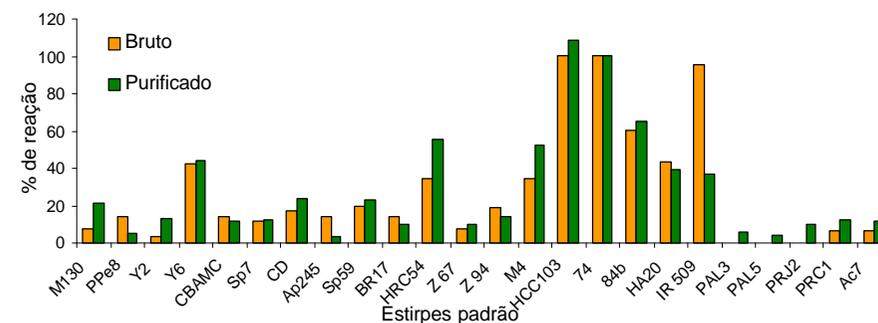


Figura 8: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados em coluna contendo proteína A, contra a estirpe 74 de *H. frizingense*.

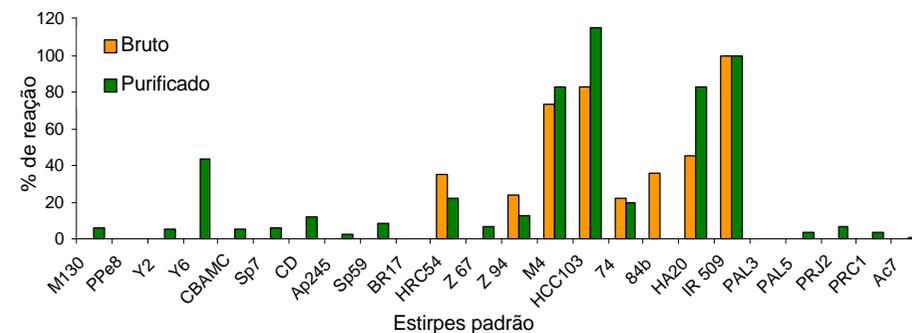


Figura 9: Especificidade dos anticorpos policlonais brutos e purificados em coluna contendo proteína A, contra a estirpe IR509 de *Herbaspirillum* spp.

reação cruzada acima de 20%, recomenda-se um posterior tratamento para eliminação dos anticorpos inespecíficos. Neste caso, o antissoro foi purificado em coluna com proteína A e submetido a um novo teste de reação cruzada. Após a purificação, apenas foi observado queda no valor de reação com o isolado IR509 sendo que os índices de reação cruzada com outros microrganismos continuaram elevados, ocorrendo até aumento de reação com a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*. A alta reação com estirpes de *H. rubrisubalbicans* é justificável pela maior proximidade genética de *H. frizingense* com esta espécie, se comparado com *H. seropedicae* (Kirchhof et al., 2001). No caso de *A. amazonense* Y6, tem sido observado reação com a maioria dos anticorpos produzidos independentemente da espécie do antígeno usado nas imunizações (Silva, 1999). Vale lembrar que este antissoro, juntamente com HA20, que será discutido adiante, foram os que apresentaram menores valores de aumento de resposta imunogênica com o aumento de inoculações, relacionando inespecificidade com baixa resposta à inoculações.

O antissoro desenvolvido com a estirpe IR 509 apresentou reação cruzada acima de 60% contra as estirpes M4 e HCC 103 de *H. rubrisubalbicans* a após a purificação contra HA20 (Figura 9). Todos pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* seja ele *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC 103) ou *Herbaspirillum* spp.. Os isolados de *H. seropedicae* (HRC 54, Z 67 e Z 94) obtiveram reações abaixo de 40%. Este soro pode ser usado na diferenciação de espécies de *Herbaspirillum*.

O antissoro HRC54 (Figura 10), apresentou alguma inespecificidade quando bruto. Já purificado, reagiu apenas com isolados da mesma espécie. Considerando o valor de 20% de reação cruzada, as estirpes Sp245 de *A. brasilense* e UAP-Ac7 de *G. diazotrophicus* não diminuíram os valores, mas não chegando a comprometer a qualidade do antissoro que foi considerado espécie-específico, por reagir em torno de 60%, com outras estirpes da mesma espécie. Este soro, quando testado com outros isolados de arroz, classificados como *H. seropedicae* por testes com fonte de carbono, não reconheceu todos os isolados (Luciana Rodrigues,

inoculação (pré imune), após a terceira inoculação (parcial) e após 7 inoculações (final), correspondendo ao aumento da produção de anticorpos específicos ao antígeno alvo. Juntamente, foi determinada a curva de diluição do anticorpo e a melhor diluição a ser utilizada na técnica de ELISA indireta. Para tal, os anticorpos foram avaliados pela técnica de ELISA indireta, em diluições variando de 1:500 a 1:20.000.

#### *Determinação da Especificidade*

Os anticorpos produzidos foram testados contra outros microrganismos diazotróficos crescidos no mesmo meio de cultura (SYP). Esta avaliação é dita reação cruzada e serve para determinar se os epitopos dos determinados antígenos são específicos ou são comuns a outros organismos. Para tal, foi colocado numa mesma placa diferentes estirpes e espécies de bactérias, todos ajustados com densidade ótica correspondente a  $10^8$  células/mL (tabela 3). A escolha de quais microrganismos testar dependeu do anticorpo alvo, tendo sido priorizando aqueles de mesmos gêneros e espécies encontradas associados à cultura de cana-de-açúcar. Para os anticorpos produzidos contra estirpes de *Herbaspirillum* spp. utilizou-se um maior número de estirpes de bactérias do mesmo gênero e gêneros próximos geneticamente. Já para *Gluconacetobacter* spp. foi usado um maior número de estirpes da própria espécie e da família *Acetobacteriaceae*.

#### *Purificação dos Anticorpos*

Para proceder o uso da coluna de purificação deve-se ler atentamente o procedimento descrito pelo fabricante, pois cada coluna possui um protocolo ideal de utilização bem como a capacidade de troca. A coluna utilizada neste protocolo foi Hi-Trap da BioRad. Inicialmente a coluna foi preenchida com 10 mL de Tampão de Ligação solução 20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7 (Apêndice), para equilibrar a coluna. Depois aplicou-se a amostra de anticorpos diluída 1:50 (200  $\mu\text{l}$  de soro mais 9.800  $\mu\text{l}$  de Tampão de Ligação). Para desprender as imunoglobulinas diferentes das de classe G, lavou-se a coluna com 3 mL do Tampão de Ligação. Até esta fase não se coleta nenhuma alíquota. Posteriormente 3 mL de Tampão

Tabela 3: Relação das bactérias usadas nos testes de especificidade do anticorpos produzidos contra o gêneros *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* e seus respectivos dados ecológicos

Estirpe	Espécie	Local de isolamento	Planta associada	Parte da planta
M130 <sup>1</sup>	<i>B. brasilense</i>	Brasil	Arroz	Raiz
PPe-8 <sup>1</sup>	<i>B. tropicalis</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raiz
HRC54	<i>H. seropedicae</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raiz
Z67 <sup>1</sup>	<i>H. seropedicae</i>	Brasil	Arroz	Raiz
Z94	<i>H. seropedicae</i>	Brasil	Arroz	Raiz
HA20	<i>Herbaspirillum</i> spp.	Brasil	Arroz	Raiz
IR509	<i>Herbaspirillum</i> spp.	Filipinas	Arroz	Raiz
74B	<i>H. frisingense</i>	Brasil	<i>P. purpureum</i>	Colmo
84B <sup>1</sup>	<i>H. frisingense</i>	Brasil	<i>P. purpureum</i>	Colmo
HCC103	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Colmo
M4 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Folhas
B-4362 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Folhas
M1 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Maurítius	Cana-de-açúcar	Folhas
HRC51 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raízes
M5 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Reunion	Cana-de-açúcar	Folhas
IBSBF 198 <sup>1</sup>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	Maurítius	Cana-de-açúcar	Folhas
Sp59	<i>A. lipoferum</i>	Brasil	Trigo	Raiz
BR17	<i>A. lipoferum</i>	Brasil	Milho	Raiz
Y2	<i>A. amazonense</i>	Brasil	Trigo	Raiz
Y6	<i>A. amazonense</i>	Brasil	<i>P. purpureum</i>	Raiz
CBAMC	<i>A. amazonense</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raiz
Cd	<i>A. brasilense</i>	Israel	<i>Cynodon dactylon</i>	Rizosfera
Sp7	<i>A. brasilense</i>	Brasil	<i>Digitaria</i> sp.	Raiz
Ap245	<i>A. brasilense</i>	Brasil	Milho	Raiz
PAL5	<i>G. diazotrophicus</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Colmos
PAL3	<i>G. diazotrophicus</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Colmos
PRJ2	<i>G. diazotrophicus</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raízes
PRC1	<i>G. diazotrophicus</i>	Brasil	<i>P. purpureum</i>	Colmos
UAP-Ac7	<i>G. diazotrophicus</i>	México	Abacaxi	Pseudo caule
PPe-4 <sup>2</sup>	<i>G. diazotrophicus</i>	Brasil	Cana-de-açúcar	Raízes
	<i>G. pasteurianus</i> <sup>2</sup>			
	<i>G. hansenii</i> <sup>2</sup>			
	<i>G. acetii</i> <sup>2</sup>			
	<i>Frateuria</i> <sup>2</sup>			

<sup>1</sup>: Testado apenas com os anticorpos produzidos contra IR509 e HA20

<sup>2</sup>: Testado apenas com os anticorpos produzidos contra o gênero *Gluconacetobacter* spp.

### 3.3- Determinação da Especificidade

Os anticorpos são classificados em IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, sendo que IgG representa 75% das imunoglobulinas totais, portanto amplamente utilizado em técnicas imunológicas. As primeiras imunoglobulinas produzidas, são IgM, IgE, seguidas por IgD e IgA, que são ditas inespecíficas, finalmente são produzidas as IgG, ditas específicas. Para aumentar a especificidade dos anticorpos produzidos, efetuou-se purificação do IgG por cromatografia de afinidade em colunas contendo proteína A ligada a agarose (Bio-Rad).

A afinidade da proteína A, extraída de *Staphylococcus aureus*, especialmente por anticorpos do tipo IgG, é uma propriedade útil para separar imunoglobulinas.

A especificidade foi determinada através de testes de reação cruzada contra 5 gêneros de bactérias diazotróficas e diversas espécies (Tabela 3). Foram testados os antissoros brutos e purificados com através do uso da proteína A e visando diminuir as imunoglobulinas inespecíficas.

O teste de reação cruzada é considerado o principal parâmetro de qualificação de um antissoro, sendo determinante na decisão de possibilidade de uso ou não de um antissoro que apresentou baixos valores de densidade ótica na curva de diluição.

Gênero *Herbaspirillum* spp.

Dentre os soros produzidos contra estirpes do gênero *Herbaspirillum*, o antissoro 74 (Figura 8), apresentou baixos valores de densidade ótica com o aumento do número de inoculações (item anterior), e em testes de reação cruzada, do antissoro bruto foi apresentada alta reação com a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae*, Y6 de *A. amazonense* e HA20 e IR509 com comportamento de *H. rubrisubalbicans* em fonte de carbono. Além disso, também foram observadas reações, apesar dos baixos valores, contra bactérias de outras espécies. Segundo Olivares (1997), para um antissoro com percentuais de

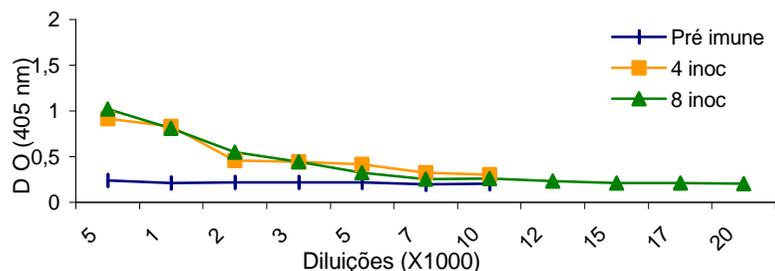


Figura 6: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe PRC1 de *G. diazotrophicus*

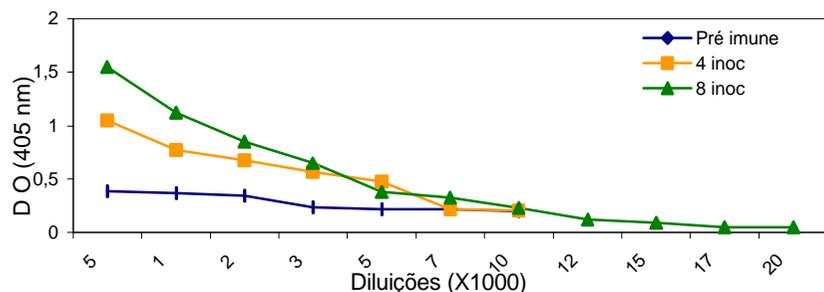


Figura 7: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe UAP-Ac7 de *G. diazotrophicus*

Ácido Cítrico (0,1 M; pH 3) foram aplicados para eluir as imunoglobulinas Ig1 e Ig2 responsáveis pela maior especificidade. Nesta etapa a amostra foi coletada em recipiente de vidro estéril, contendo 500  $\mu$ l de Tris-HCl (1 M; pH 9) para equilibrar o pH da solução. Finalmente a coluna foi lavada com 5 mL de etanol 20% e deixado um alíquota de 1 mL de etanol preenchendo a coluna para conservá-la até reutiliza-la para outras purificações. Em todas as etapas o fluxo deve ser mantido por gravidade.

### Teste de Sensibilidade

Este teste foi realizado para determinar o nível mínimo de detecção do antígeno, útil principalmente em ensaios de detecção destes microrganismos de amostras ambientais. Para tal, as placas de poliestireno, utilizadas na técnica de ELISA indireta, foram impregnadas com diluições do antígeno variando de  $10^8$  a  $10^3$  células por mL. Inicialmente mediu-se a densidade ótica dos antígenos a 436 nm, ajustando-se para 1,0 e 0,8 para os gêneros *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter* spp. respectivamente, que segundo Silva (1999), estes valores correspondem a  $10^8$  células por mL, considerado pela literatura o número ideal para a técnica de ELISA indireta. Após o ajuste da densidade ótica, as amostras foram diluídas em série de 1:10 até  $10^3$  células por mL.

## 3. Resultados

### 3.1- Procedimentos a serem adotados durante o Período de Imunizações

O processo de produção do soro deve ser acompanhado com visitas periódicas ao biotério, observando o estado dos animais, disponibilidade de alimento, condições do ambiente, que deve ser calmo e arejado e evitar contato com outros animais. Ter cuidado especial com sarna, que se desenvolve com frequência em épocas quentes principalmente na região interna da orelha. Observar também possíveis ferimentos e erupções na pele devido as imunizações, que devem ser tratados para evitar presença de moscas.

Tanto as imunizações como coleta de sangue são procedimento simples, que podem ser realizados sem treinamento especializado, sempre com auxílio de outra pessoa para segurar o animal. Os cuidados nestas operações referem-se ao modo de segurá-lo, nunca pelas patas, pois são frágeis e fraturam facilmente, sendo que se isso ocorrer, provavelmente terá que descartar o animal. Segurar sempre pelas orelhas com uma mão e a outra no centro do corpo. Os procedimentos devem ser realizados sobre uma superfície plana, para evitar que o animal se bata, podendo provocar ferimentos. Para as imunizações no músculo da pata traseira, recomenda-se alternar a pata que irá receber o antígeno. Se na segunda semana foi imunizada a pata direita, na semana seguinte será a pata esquerda, para evitar hematomas ou perfuração de uma área dolorida. Para a coleta de sangue da orelha foi esfregado xilol sobre a mesma, para dilatar a veia e posto num algodão para o animal cheirar e ficar calmo, permitindo a retirada sem maiores ferimentos. Importante neste procedimento é, observar a espessura da agulha para coleta de sangue. Vários diâmetros foram utilizados e foi observado que, se a agulha for muito grossa fica difícil pegar a veia e ou estancar o sangue após retirada. Porém se mais fina, evita este problema, mas provoca hemólise do sangue, misturando-o com hemáceas e proteínas que causam reações inespecíficas. Portanto, verificou-se que a melhor agulha para retirada de amostras de sangue da veia marginal da orelha e inoculações intramusculares e subcutâneas foi 25 G 5/8.

### 3.2- Verificação da Produção de Anticorpos e Curva de Diluição

A determinação da melhor proporção antígeno-anticorpo é necessária porque a medida que maiores concentrações de anticorpo são adicionadas a uma quantidade constante de antígeno (ideal  $10^8$  células/mL) haverá excesso de anticorpo atrapalhando a reação, resultando no efeito denominado de pro-zona, isto é, diminuição do sinal por excesso de anticorpo (diluições abaixo de 100). O contrário também deve ser quantificado, verificando qual o máximo de diluição do anticorpo sem perda de sinal.

Como observado para o gênero *Herbaspirillum*, nestes antissoros (Figuras 5, 6 e 7), também houveram variações da resposta imunogênica e porcentagem de aumento relacionadas com o estágio das imunizações. Vale ressaltar aqui que os valores de título final poderiam ser maiores se retirados 5 dias após a última imunização como descrito acima, período em que se observa maior concentração de anticorpos, porém estas amostras foram retiradas aproximadamente 10 dias após devido problemas técnicos.

O antissoro UAP-Ac7 de *G. diazotrophicus* isolada de abacaxi, apresentou maior reação, com densidade ótica em torno de 1,5 após a sétima inoculação, sendo que o restante ficou em torno de 1,0, valores semelhantes aos encontrados por Silva (1999) e Reis (1997). Após os testes foi definida a diluição dos antissoros brutos de 1:1000 para anti-UAP-Ac7 e 1:500 para o restante dos antissoros.

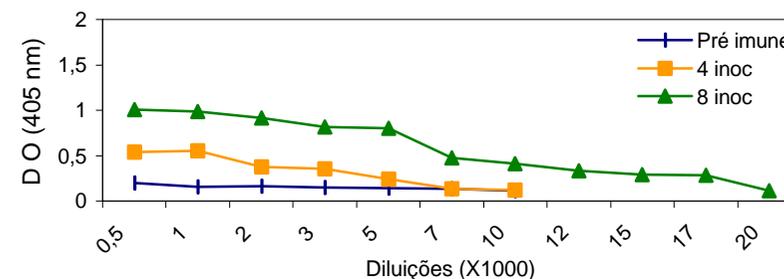


Figura 5: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*

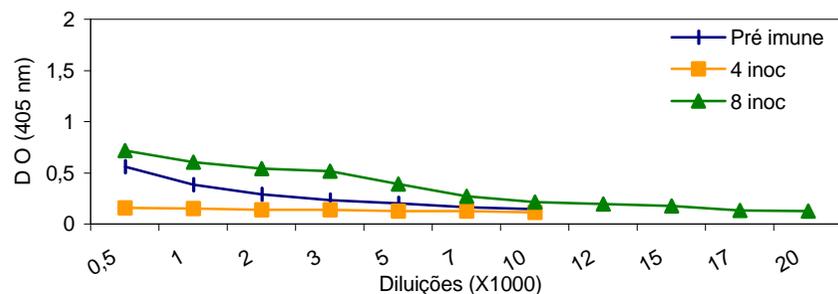


Figura 4: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe HA20 de *Herbaspirillum* spp.

#### Gênero *Gluconacetobacter* spp.

Após a criação do gênero *Gluconacetobacter* as espécies descritas para outros gêneros foram reclassificadas com base na composição parcial dos ácidos nucleicos do DNA ribossomal pertencente a sub-unidade 16 S (Yamada et al., 1997). Esta nova descrição incluiu a espécie *Acetobacter diazotrophicus* isolada a princípio de cana-de-açúcar com as estirpes padrão PAL-5, PRJ-2 e Ppe-4 (Cavalcante & Dobereiner, 1988). Estudos posteriores de isolamento permitiram identificar esta espécie como também colonizando a rizosfera e raízes de café (Jimenez-Salgado et al., 1997) e raízes e pseudo-caule de abacaxi (Tapia-Hernandez, 2000), batata doce (Paula et al., 1992), Capim Cameroon (Dobereiner et al., 1988) e mais recentemente foi detectada em tecidos de *Eleusine coracana*, uma planta hospedeira cultivada ao longo da costa de Tamil Nadu na Índia através do uso da técnica de amplificação por PCR com primer espécie-específico (Loganathan et al., 1999). Recentemente, duas novas espécies foram descritas: *G. johannae* estirpe padrão CFN-Cf 55 e *G. azotocaptans* estirpe padrão CFN-Cf54 ambas isoladas de café (Fuentes-Ramírez et al., 2001).

As amostras de sangue retiradas antes da primeira imunização (pré-imune), após a terceira (parcial) e a oitava imunização (final) foram testadas para verificar a produção e melhor diluição dos anticorpos. Pré-imune e parcial foram diluídos até 1:10.000 e verificou-se que todos os anticorpos produzidos apresentaram reação de pré-imune satisfatória e aumento de reação após a terceira imunização. Estes resultados indicaram que estava ocorrendo produção de anticorpos contra os antígenos alvo, portanto foi dada continuidade às inoculações.

Após a sétima inoculação, procedeu-se novamente o teste de diluição para verificar se a produção de anticorpos já tinha atingido valores considerados ótimos, aumentando o número de diluições até 1:20.000. Em todos observou-se aumento da densidade óptica com o aumento do número de imunizações, porém estes aumentos variaram entre os antígenos, provavelmente devido as diferenças na capacidade antigênica ou da resposta do animal, pois cada organismo pode responder de uma maneira diferenciada. Para resolver o problema da influência do animal, recomenda-se trabalhar com 2 animais para cada antígeno, porém, neste trabalho foi utilizado apenas 1 animal pelo grande número de anticorpos produzidos.

A decisão de utilização ou não de um antissoro que apresentou baixos valores de densidade óptica em curva de titulação, só pode ser tomada após obter os resultados de reação cruzada e depende muito do objetivo do pesquisador e do conhecimento do antígeno.

#### Gênero *Herbaspirillum* spp.

Atualmente o gênero *Herbaspirillum* contempla 3 espécies de bactérias diazotróficas: *H. seropedicae* estirpe padrão Z67 isolada de arroz, *H. rubrisubalbicans* estirpe padrão M4 isolada de cana-de-açúcar e *H. frisingense* estirpe padrão 84B isolada de *Pennisetum purpureum* cv Taiwan e GSF 30, isolada de *Miscanthus sacchariflorus* (Kirchhof et al., 2001). Além destas 3 espécies existe um grupo de isolados denominado *Herbaspirillum* spp. grupo 3 (Baldani et al., 1996). Este grupo não inclui bactérias diazotróficas e não foi utilizado neste estudo.

Nas figuras 1, 2, 3 e 4, observa-se a produção de anticorpos contra as estirpes de *Herbaspirillum* spp. Apenas a densidade ótica do antissoro 74, não atingiu valores considerados ótimos e mais 4 inoculações foram feitas. Após estas 4 inoculações, testou-se novamente a produção de anticorpos e foi verificado aumento, mesmo que insipiente, e o animal não foi mais imunizado. A decisão de encerrar o trabalho de imunizações no coelho que estava produzindo anticorpos contra a estirpe 74, mesmo com baixos valores de densidade ótica, foi porque se com 12 inoculações não houve estímulo suficiente do sistema imunológico, conclui-se portanto que, ou a estirpe tem baixa capacidade antigênica ou o animal baixa capacidade de respostas antigênica, e provavelmente mais imunizações não iriam resultar em maior produção de anticorpos.

Com os resultados de densidade ótica obtidos para os antissoros de *Herbaspirillum* spp., decidiu-se por usar HA20 e 74 numa diluição de 1:500 e HRC54 e IR509 diluídos 1:1000, sem purificação e aplicados nos testes posteriores, por apresentarem resultados de densidade ótica em torno de 1,0.

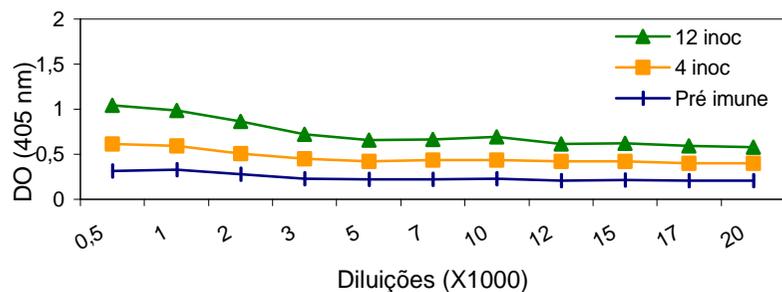


Figura 1: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe 74 de *H. frizingense*.

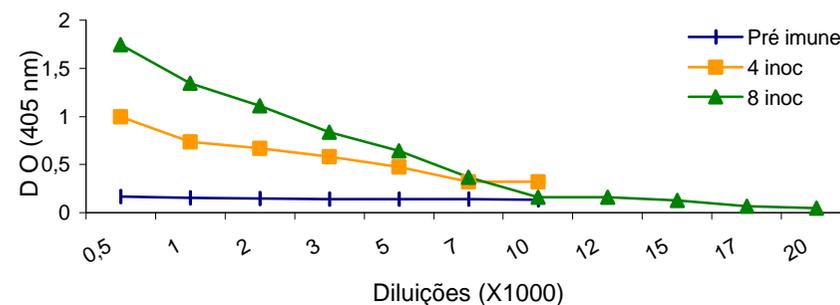


Figura 2: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe IR509 de *Herbaspirillum* spp.

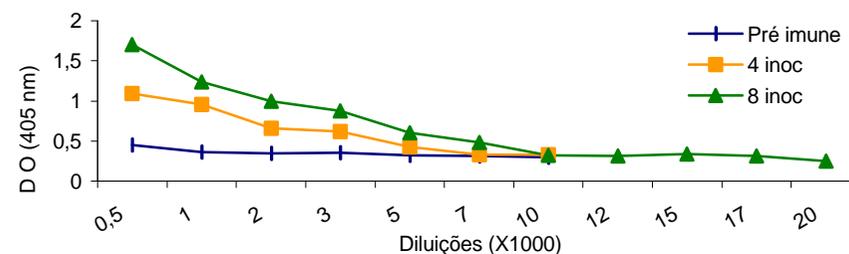


Figura 3: Verificação da produção de anticorpos específicos ao longo das inoculações e curva de diluição do soro produzido contra a estirpe HRC54 de *H. seropedicae*.