

Uso de Imunocaptura para o Isolamento de Bactérias do Ambiente



Bactérias no ambiente



Células de *Azospirillum brasilense*

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana
Diretor Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

José Ivo Baldani
Chefe Geral

Eduardo Francia Carneiro Campello

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rosângela Stralio
Chefe Adjunto Administrativo

8. Apêndice

Soluções utilizadas

1. PBS

NaCl - 8,0g.

KCl - 0,2g.

Na₂HPO₄ x 2H₂O - 1,4g.

KH₂PO₄ - 0,2g. (Completar para 1L com água destilada)

2. Solução de lavagem (em PBS)

0,05% Tween.

0,5% BSA.

3. Tampão carbonato

50mM Na₂CO₃

50mM NaHCO₃

pH 9.6

4. Tampão Papaína:

10 mM EDTA (a).

50mM Cisteína (b).

Adicionar 2,6 ml da solução (a) + 2,6 ml da solução (b) e completar para 50ml com água destilada.

pH 6.2



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

ISSN 1517-8498

Agosto/2005

Documentos 198

Uso de Imunocaptura para o Isolamento de Bactérias do Ambiente

Carla Cristiane dos Santos
Verônica Massena Reis

Seropédica – RJ
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Jean Luiz Simões Araújo e Gustavo Ribeiro Xavier

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2005): 50 exemplares

S237u Santos, Carla Cristiane dos.

Uso de Imunocaptura para o Isolamento de Bactérias do Ambiente /
Verônica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 16 p.
(Embrapa Agrobiologia. Documentos, 198).

ISSN 1517-8498

1. Bactéria. 2. Imunocaptura. 3. Anticorpo. I. Reis, Verônica
Massena, colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de
Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 579.3

© Embrapa 2005

REIS, V. M. **Imunologia aplicada a detecção de bactérias diazotróficas**. EMBRAPA-CNPAB, 1997a. 11 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 29).

REIS, V. M. **Técnicas imunológicas aplicadas à detecção de bactérias no ambiente**. I. O uso de anticorpos como sondas em estudos de identificação e quantificação. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997b. 22 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 33).

HRANITZKY, K. W.; LARSON, A. D.; RAGSDALE, D. W. & SIEBELING, R. J. Isolation of serovars of *Vibrio cholerae* from water by serologically specific method. **Science**, Washington, v. 210, p. 1025-1026, 1980.

KÖHLER, R. G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. **Nature**, London, v. 256, p. 495-497, 1975.

LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIER, H.; BARAKAT, M.; HARTMANN, A.; HEULIN, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 2207-2223, 2000.

LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, ZVI, E. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd. in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 358-364, 1987.

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

MAVINGUI, P.; LAGUERRE, G.; BERGE, O.; HEULIN, T. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 1894-1903, 1992.

REIS JR., F. B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 1998. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Autores

Carla Cristiane dos Santos

Biólogo, MSc. em Biotecnologia Vegetal pela UFRJ.

Verônica Massena Reis

Eng. Agrônomo, PhD em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.

BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

7. Referências Bibliográficas

ACHOUAK, W.; THIÉRY, J. M.; ROUBAUD, P.; HEULI, T. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugata* in bulk soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 31, p. 11-19, 2000.

BRUNEL, B.; CLEYET-MAREL, J. I.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2636-2642, 1988.

CHASE, M. **Production of antiserum**. Methods in Immunology and Immunochemistry, v.1, p.197-209, 1967.

CHESS, L.; MACDERMOTT, R. P.; SCHLOSSMAN, S. T. Immunologic functions of isolation human lymphocyte subpopulations. I. Quantitative isolation of human T and B cells and response of mitogens. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 113, p. 1113-1121, 1974.

CHRISTENSEN, B.; TORSVIK, T.; LIEN, T. Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from north sea oil field waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 1244-1248, 1992.

DYE, M. The enrichment of *Rhizobium* from a model system using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 19, p. 235-245, 1994.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3153-3158, 1998.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Isolation of *Azospirillum* spp. From natural soils by immunomagnetic separation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 975-981, 1998.

adicionando-se 5 mg de $Al_2(SO_4)_3$. A mistura é mantida em repouso por 10 min sobre a bancada e o sobrenadante (15 mL) é pipetado com cuidado, passado em filtro Millipore® (5 μ m) e centrifugado (10.000 rpm a 10°C; 10 min). O precipitado formado é ressuspendido em 1 mL de tampão PBS e adicionado às placas de imunocaptura.

5.1. Amostras de plantas

Utiliza-se 1g do material vegetal fresco e macera-se em 9 mL de tampão fosfato salino (PBS). A seguir, adiciona-se 0,2 g de polietileno-glicol (PEG 6.000 a 8.000) e 0,2 g de resina Chelex 100, para eliminar as ligações orgânicas e iônicas presentes entre as bactérias e o material vegetal. As amostras são incubadas (1 h sob agitação ~60 rpm; 4°C). O material é filtrado em papel de filtro (Whartman) e, em seguida, em filtro de 5 μ m para eliminação de materiais grosseiros das amostras de plantas. As amostras são centrifugadas (10.000 rpm por 10 min.) e ressuspendidas em 1 mL de PBS sendo então adicionadas às placas de imunocaptura.

6. Considerações finais

A busca por microrganismos no ambiente, com foco para aqueles que podem ser usados para o crescimento vegetal ou mesmo para novos propósitos biotecnológicos, como a obtenção de antibióticos, têm crescido nas últimas décadas. A aplicação de técnicas imunológicas tornou-se uma ferramenta simples, de uso universal e que pode ser usada em laboratórios de microbiologia. Este documento mostra como é fácil a aplicação desta ferramenta na captura de microrganismo de amostras de solo ou tecidos vegetais, sem que etapas de cultivo e purificação sejam necessárias. As principais vantagens são o tempo mais curto para a obtenção da cultura pura e a captura por atração ao soro onde não há etapas de cultivo em meios sintéticos onde ocorre a adaptação do microrganismo às novas condições. Este procedimento imunológico permite que o isolado obtido seja o mais próximo possível daquele que está vivendo no ambiente sem gerar modificações genéticas, que ocorrem no caso de bactérias.

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 enfoques 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 da 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 198 refere-se ao uso da técnica de Imunocaptura para o isolamento de bactérias do ambiente. Trata-se de técnica simples e de uso universal que permite a captura de microrganismos de amostras de solo ou tecidos vegetais sem que etapas de cultivo e purificação sejam necessárias. Apesar da grande diversidade de microrganismos existentes no ambiente nem sempre o microrganismos alvo é encontrado em números elevados. Neste caso, a técnica de imunocaptura com anticorpos específicos é aplicada com sucesso no isolamento dos microrganismos. O avanço de conhecimento sobre os microrganismos presentes no ambiente tem crescido nas últimas décadas em razão da demanda pela descoberta de novos microrganismos com potencial de uso na agricultura e biotecnologia. Portanto, técnicas como a imunocaptura que permite o isolamento de microrganismos de ambientes complexos tem papel importante a desempenhar nos estudos de microbiologia do solo.

José Ivo Baldani
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Obtenção do Soro.....	7
3. Imunocaptura	8
4. Procedimentos para imunocaptura	11
5. Preparo das Amostras	11
5.1. Amostras de plantas	12
6. Considerações finais.....	12
7. Referências Bibliográficas	13
8 Apêndice	16

uma metodologia para maximizar a detecção de bactérias no ambiente.

4. Procedimentos para imunocaptura

Placas de ELISA contendo 96 poços da marca NUNC ou GREINER são cobertas com 200 µl de uma solução de proteína A solúvel (Sigma - 1mg/mL), diluída 1:50 em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M) e guardadas por uma noite (16 a 18 h) em geladeira comum (~ 4°C). Em seguida as placas são lavadas uma vez com tampão PBS (pH 7,2) e se adiciona 200 µL do soro escolhido sem purificação (soro bruto) diluído 1:1000 em PBS (1:10 v.v.). Em seguida as amostras são incubadas a 37°C por 1h sob baixa agitação (~ 60 rpm) e novamente lavadas 2 x com tampão PBS. A seguir se adiciona 200 µL da suspensão de material do solo por poço e incuba-se 37°C por 2 h. A partir dessa etapa toda a metodologia é realizada em ambiente estéril (deixar a lâmpada de UV do fluxo laminar ligada durante 20 min antes do uso). As placas são lavadas (5x) com solução de lavagem previamente esterilizadas em filtro Millipore® (0,2 µm). A seguir é realizada a digestão enzimática do anticorpo com 200 µl de papaína (Sigma) diluída 1:50 (p:v) em tampão papaína e incubada à temperatura de 37°C por 1h sob baixa agitação (~ 60 rpm). Ao final, a suspensão é retirada dos poços (pipeta) e inoculada nos respectivos meios semi-sólidos próprios para o isolamento de bactérias. Nesta fase faz-se o uso de meios de cultivo específicos para o organismo ao qual se deseja trabalhar

5. Preparo das amostras

Amostras de solo - Utilizam-se 5 g de solo livres de pedaços de raiz (retirados a olho nu com auxílio de uma pinça de ponta fina), ressuspendido em 45 mL de H₂O destilada e estéril. A seguir adiciona-se 0,5g de resina Chelex 100 (Sigma) e 0,5g de poli-etileno glicol (PEG 6.000 a 8.000). A mistura é mantida sob agitação de 150 rpm em câmara fria (4°C por 30 min.). Essa suspensão é filtrada em filtros de papel tipo Melita® para reter as partículas mais grosseiras do solo e a resina. A argila em suspensão é retirada por floculação

Outra técnica aplicada aos estudos de detecção de microrganismos no ambiente consiste na imunocaptura magnética - IMS. O método é baseado no princípio de que um tipo de célula particular pode ser selecionado de uma mistura heterogênea pela reação específica com o anticorpo fixado a grânulos de poliestireno que no seu interior possuem metal que é atraído para um ímã (DYE, 1994). CHRISTENSEN et al., (1992) usaram esta técnica para recuperar bactérias termófilas redutoras de sulfato provenientes da extração de óleo em águas marítimas. Essas estirpes foram similares a *Thermodesulfobacterium mobile*, as quais não foram isoladas através da metodologia convencional. HAN & NEW (1998) adaptaram essa técnica para isolar *Azospirillum* do solo. A presença do solo reduziu a recuperação da bactéria adicionada em 2 a 5 vezes. A especificidade desta técnica depende da especificidade do anticorpo e a seletividade do meio usado para a cultura das bactérias imunocapturadas.

Como esta técnica de imunocaptura magnética foi primeiramente desenvolvida para a separação de células do sangue, o maior conhecimento advém dessa área. É amplamente usada no isolamento de bactérias que causam enterites, como por exemplo, *Campylobacter jejuni*, uma bactéria que pode ser encontrada tanto em alimentos de origem animal ou vegetal.

Esta técnica normalmente é associada a outras como observado nos exemplos a seguir. Pode-se inicialmente capturar a bactéria através de imunocaptura magnética e em seguida pode ser aplicada uma outra técnica como a amplificação por PCR (reação de cadeia da polimerase) do DNA genômico que codifica RNAr para confirmar a espécie. GRANT et al., 1998 desenvolveram um método para detecção de *Mycobacterium paratuberculosis* em amostras de leite, sendo que a detecção pode ser mais exata conjugando a imunocaptura com o PCR ou ELISA. Comparando o uso da imunocaptura com amplificação utilizando PCR com outras técnicas de detecção como o próprio PCR e "dot-blot" (hibridização em membrana) para a detecção do vírus do mosaico da cana-de-açúcar, observou-se que a imunocaptura acoplada a técnica de PCR foi superior as outras técnicas. Desta forma, podemos utilizar mais de

Uso de Imunocaptura para o Isolamento de Bactérias do Ambiente

Carla Cristiane dos Santos
Verônica Massena Reis

1. Introdução

O ambiente de solo contém diferentes populações bacterianas que habitam diversos nichos ecológicos. Quando se trata de inoculação e efeitos positivos provenientes dessa inoculação, é essencial usar um método mais adequado para a identificação e quantificação da estirpe empregada visando monitorar a bactéria e avaliar a eficiência do processo de inoculação (LEVANONY et al., 1987). Uma vez que o solo e a rizosfera da planta possuem nichos ecológicos que suportam enormes populações de bactérias, qualquer tentativa para detectar uma estirpe específica usando meio semi-seletivo nem sempre é bem sucedida, pois geralmente subestima o número de microrganismos existentes. Devido a dificuldade do isolamento, tem-se buscado novas metodologias que possibilitam isolar e também cultivar bactérias. Para tais fins, métodos imunológicos, utilizando anticorpos específicos, têm sido aplicadas com sucesso (LEVANONY et al., 1987).

A especificidade e sensibilidade de qualquer técnica imunológica são fatores críticos para o êxito do monitoramento de uma determinada bactéria no ecossistema, na rizosfera ou nas raízes, onde diversas populações de bactéria podem coexistir e o número de bactérias alvo pode ser muito baixo (LI & MACRAE, 1992).

2. Obtenção do soro

Para a produção de anticorpos podem ser utilizadas células inteiras de bactérias, ou de qualquer outro organismo, bem como partes dessas células ou até mesmo de uma molécula isolada (REIS, 1997ab). Os anticorpos são produzidos pelo sistema imune do animal, através de sua estimulação com a inoculação de um agente

estranho, aonde as células específicas (linfócitos) irão se proliferar e diferenciar para produzir anticorpos contra aquele antígeno injetado. Uma vez produzidos, eles ficam armazenados no organismo do animal que está sendo utilizado para a produção do anticorpo. Cada vez que um animal é exposto ao antígeno, uma variedade de anticorpos é produzida. Existem três tipos de anticorpos, citados na literatura: os monoclonais, os policlonais e os recombinantes. Os anticorpos monoclonais são geralmente obtidos através do cultivo de células especiais denominadas hibridomas e reconhecem apenas um epitopo do antígeno (KÖHLER & MILSTEIN, 1975). Os anticorpos policlonais são produzidos por animais imunizados e consistem do resultado de uma mistura de determinantes antigênicos, principalmente os usados para a imunização (CHASE, 1967). O último tipo - recombinantes - refere-se aos anticorpos produzidos a partir da seqüência gênica presente na região variável do anticorpo de mamíferos usando técnicas de cultivo de células e biologia molecular.

3. Imunocaptura

A técnica de Imunocaptura foi desenvolvida por CHASS et al. (1974) para separação específica e isolamento de células ósseas humanas, e a partir daí sofreu várias adaptações para o isolamento de bactérias presentes na água, solo, e amostras de plantas (HRANITZKY et al., 1980; BRUNEL et al., 1988). Esta técnica de captura imunológica baseia-se no fato de que os anticorpos ligam-se a proteína A, que é previamente adsorvida nos poços de placas de poliestireno utilizadas nos testes de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Com a adição das amostras, as bactérias que tem afinidade com os anticorpos são capturadas. Lavagens sucessivas eliminam o material restante (inclusive outras bactérias não ligadas aos anticorpos), portanto, teoricamente só restarão nas placas o complexo formado pela proteína A ligada covalentemente ao anticorpo e este da mesma forma a grupo de bactérias. Com a adição de uma enzima (papaína) que desnatura o anticorpo, estas bactérias são liberadas para a solução.

Anticorpos também podem ser usados para o isolamento de microrganismos do ambiente. A técnica de imunocaptura de bactérias do solo e rizosfera foi desenvolvida por MAVINGUI et al., (1992) para isolamento de *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*) de solo e da rizosfera de trigo. Esta técnica consiste no uso de microplacas de poliestireno com 96 poços revestidas com anticorpos anti-*Paenibacillus polymyxa* onde é adicionada a amostra de solo. Após diversos passos de incubação e lavagem, a ligação da bactéria com o anticorpo é quebrada pela adição de KCl (0,1M). Os autores observaram que o tamanho da população de *P. polymyxa* em solos livres de raízes era menor que 0,1% do total da microflora. Quando a técnica de imunocaptura foi usada a porcentagem de *P. polymyxa* isolados passou de 10 para 20% comparando a metodologia tradicional com a de imunocaptura. Com o emprego desta técnica, vários outros isolados foram obtidos de locais onde havia rotação de culturas de milho, trigo e *Brassica napus* L., totalizando 130 novos isolados (MAVINGUI et al., 1992).

Para melhorar o isolamento de *Pseudomonas corrugata* foi desenvolvida imunocaptura acoplada ao uso de meio de cultivo semi-seletivo. A diversidade de *P. corrugata* foi maior em solo onde havia rotação de cultura (milho/trigo) do que em solos sob o cultivo de milho por 23 anos. Embora essa bactéria seja facilmente isolada de tecidos vegetais por ser uma eficiente colonizadora, observou-se que a maior diversidade bacteriana era encontrada no solo da rizosfera, principalmente em amostras colhidas em solos não cultivados previamente com culturas sob rotação (ACHOUAK et al., 2000).

REIS JR. (1998) utilizou a técnica de imunocaptura com algumas modificações para isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* de quatro amostras de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143 crescidas no campo. Com a utilização da técnica foram obtidos três isolados das quatro amostras avaliadas, enquanto que a utilização da metodologia tradicional não permitiu o isolamento de *G. diazotrophicus*. LEBUHN et al. (2000) utilizaram a mesma técnica com algumas modificações (uso de tampão glicina/HCl para a liberação da bactéria), para isolar *Ochrobactrum* sp de raízes de trigo crescidas em diferentes solos.