



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

**III. SEPARAÇÃO POR IMUNOCAPTURE PARA USO EM AMOSTRAS DE
SOLO E PLANTA**

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**



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

**III. SEPARAÇÃO POR IMUNOCAPTURA PARA USO EM AMOSTRAS DE
SOLO E PLANTA**

V.M. Reis e F.B. Reis Júnior

Embrapa-CNPAB. Documentos, 36

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

Comitê de Publicações

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

REIS, V.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Técnicas imunológicas aplicadas à detecção de bactérias no ambiente. III. Separação por imunocarpa para uso em amostras de solo e planta.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 13p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 36).

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

CDD 571.96

© Embrapa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	5
3. TÉCNICAS DE IMUNOCAPTURA	5
3.1. CAPTURA NÃO MAGNÉTICA.....	5
3.2. CAPTURA MAGNÉTICA.....	7
4. OUTRAS TÉCNICAS DISPONÍVEIS.....	9
a. FLUXO CITOMÉTRICO	10
b. ANÁLISE DE IMAGENS E UTILIZAÇÃO DE CÂMERAS DE CCD (CHARGE-COUPLED DEVICE) ..	10
c. RADIOIMUNOENSAIO	11
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	11
6. AGRADECIMENTOS.....	11
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS APLICADAS À DETECÇÃO DE BACTÉRIAS NO AMBIENTE. III. SEPARAÇÃO POR IMUNOCAPTURA PARA USO EM AMOSTRAS DE SOLO E PLANTA

V.M. Reis¹ e F.B. Reis Júnior²

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços do uso da imunologia na área agrícola foram capazes de desenvolver métodos que são utilizados na captura de microrganismos presentes em amostras de solo, água e planta. Esta captura é baseada no desenvolvimento de anticorpos específicos produzidos a partir de biomoléculas presentes na superfície da célula microbiana. A capacidade de marcar estes anticorpos como ímãs permitiu a captura de bactérias nas mais variadas condições em seu nichos ecológicos. Esta captura é utilizada para se avaliar a biodiversidade da espécie alvo em diversas condições de estresse ambiental. Daí o grande impulso que estas técnicas estão recebendo no sentido de melhorar a abrangência de detecção em amostras mistas (comunidade natural). A grande vantagem destes métodos é que permitem o cultivo posterior das células, como se fosse um isolamento.

Este documento visa esclarecer dúvidas e descrever duas técnicas de marcação paramagnética utilizadas no enriquecimento de células de bactérias *diazotróficas presentes em plantas e usadas com sucesso no laboratório de gramíneas (Embrapa Agrobiologia)*. Também descreve suscitadamente outras técnicas disponíveis que estão sendo usadas na ecologia microbiana, apenas para ilustrar a importância que se tem dado nesta área de pesquisa básica.

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

² Aluno do Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, UFRRJ, Bolsista da Embrapa-CNPAB.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todos os esclarecimentos sobre a produção e caracterização de anticorpos usados como sondas foram descritos anteriormente por Reis et al. (1997). Estes preceitos básicos também são aplicados nestas técnicas e os protocolos descritos a seguir são feitas observações para a adaptação das mesmas.

3. TÉCNICAS DE IMUNOCAPTURA

3.1. *Captura não magnética*

Esta técnica foi desenvolvida para separação específica e isolamento de células ósseas humanas e adaptada para o isolamento de bactérias presentes na água, solo e amostras de plantas (Hranitzky et al., 1980; Van Vuurde, 1987; Brunel et al., 1988). Foi usado por Mavingui et al., (1990) para isolar *Bacillus polymyxa* de raízes lavadas e de rizosfera de trigo. Esta técnica já sofreu outras modificações visando a adaptação para melhorar o isolamento de bactérias diazotróficas. O protocolo aqui citado foi utilizado recentemente em nosso laboratório para a imunocaptura de *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp em amostras de cana-de-açúcar (Reis Júnior, F.B. tese de mestrado, em preparação).

Procedimento:

1. Nesta metodologia usa-se placas especiais do tipo ELISA fabricadas pela NUNC ou GRAINER e denominadas “MaxiSorp”. Estas placas devem ser compradas com tampa para evitar contaminações. Placas de ELISA de poliestireno não funcionam com esta metodologia. As placas devem ser novas e estéreis e não se aconselha a reutilização.

2. Diluir 1 mg de proteína A (Sigma) em 1 ml de tampão carbonato, pH 9,6 (Reis et al., 1997). Esta solução estoque pode permanecer na geladeira a 4°C por no máximo 30 dias. Antes do uso, diluir 1:200 da solução estoque no mesmo tampão e cobrir as placas com 300 µl dessa solução por poço e incuba-se a 4°C durante a noite (18 hs).

3. Lavar a placa com 300 µl de PBS diluído (1/10) por poço.

4. Cobrir a placa com o anticorpo que deve ser diluído numa solução contendo NaCl (3,3 M, pH 8,0). A diluição depende dos resultados do ELISA para título do soro (Reis et al., 1997). Neste caso, apenas a classe dos IgGs vai se ligar a proteína A. Desta forma não há a necessidade de se usar o anticorpo purificado. O anticorpo purificado também não deve ser usado, devido as mudanças estruturais que ocorrem com a fração Fc do anticorpo pela passagem em tampão glicina (pH 3,0). Deve-se apenas proceder a etapa de purificação por afinidade (Reis et al., 1997). Adicionar 0,3 ml por poço e incuba-se a 37°C por 1 h. A seguir lavar uma vez a placa com PBS diluído (1/10).

5. Adicionar os extratos de solo ou planta que devem ser preparados conforme o protocolo de ELISA indireto (0,3 ml por poço) e incuba-se a 37°C por 2 horas sob agitação leve. Em cada placa deve haver um controle positivo (adição da bactéria alvo purificada) e um controle negativo (outra bactéria qualquer, de preferência uma bactéria correlacionada com aquela que se deseja isolar). Neste preparo deve-se tomar bastante cuidado com as amostras para que todos os resíduos da resina presentes sejam lavados.

6. A partir desta fase deve-se trabalhar em condições estéreis, isto é, sobre o fluxo laminar e usando-se todas as soluções estéreis. Lavar de 5 a 7 vezes com 0,3 ml de PBS diluído (1/10) contendo BSA (0,5%) e Tween 20 (0,005%) por poço.

7. Para se romper a ligação anticorpo-bactéria dois métodos podem ser usados: O mais fácil faz uso de 0,3 ml de uma solução de glicina (100 mM; pH 3,0) por 15 minutos a temperatura ambiente. O outro é por digestão enzimática onde uma enzima é utilizada para dissolver a região do anticorpo que está ligada a bactéria (fração Fc). Para tal, faz uso de solução de papaína (Boehringer Mannheim) que é diluída (1/50) em tampão papaína obtido através da mistura de 2,6 ml da solução A (10 mM EDTA) + 2,6 ml da solução B (50 mM cisteína). Completa-se o volume para 50 ml com água destilada e ajusta-se o pH final para 6,2. Antes do uso esterilizar em membrana (Miliporo). Usar 0,3 ml e incuba-se a 37°C por 1 h, agitando levemente.

A escolha do método de liberação da bactéria para a solução vai depender da bactéria que se deseja isolar. Se a bactéria alvo não for prejudicada pelo pH 3,0 do tampão glicina, deve-se escolher este método devido a sua maior facilidade de preparo e utilização.

8. Ao final, retirar a solução de cada poço individualmente, diluir em água estéril (1/10) e plaquear no meio seletivo apropriado. Pode-se juntar as repetições de um mesmo tratamento para

se diminuir o número de placas usadas. No caso de bactérias diazotróficas este protocolo foi modificado para a inoculação em meio de cultura semi-sólido sem N que limita o crescimento de bactérias não fixadoras (escolher o meio de cultura mais apropriado para o microrganismo que se deseja isolar).

9. A partir desta etapa procede-se conforme um isolamento clássico do microrganismo alvo. O crescimento típico no meio semi-sólido já é uma indicativa da presença do microrganismo alvo. Devido a facilidade de isolamento, pode-se passar diretamente para a etapa de purificação em placa, segundo Döbereiner et al., (1995).

Vantagens: pode-se processar um grande número de amostras e o isolamento é mais efetivo que os métodos clássicos. O número de isolados positivos depende da qualidade e quantidade da população total no ecossistema amostrado, bem como da especificidade do anticorpo.

Desvantagens: O nível mínimo de detecção do método fica em torno de 10^5 células/ml.

3.2. Captura magnética

Anticorpos podem ser acoplados a partículas paramagnéticas. Esta técnica, que foi desenvolvida para isolamento de células específicas provenientes do sangue (Lea et al. 1985), é também efetiva para enriquecimento seletivo e isolamento de bactérias de soluções aquosas e suspensões heterogêneas (Luk & Lindberg, 1991; Morgan et al. 1991; Skjerve et al., 1990). As bactérias são recuperadas usando-se um concentrador de partículas magnéticas. As partículas magnéticas podem variar de tamanho e permitem que estirpes puras sejam isoladas diretamente da amostra, sem crescimento prévio. Esta técnica foi desenvolvida para antígenos de superfície e para tal, deve-se considerar a densidade do antígeno na superfície celular como também as forças de ligação antígeno-anticorpo capazes de resistir as etapas de lavagem.

Na literatura existem dois sistemas: a) o sistema baseado em anticorpos ligados a partículas magnéticas de tamanho grande (Dynabeads - 280 μm) que são adicionadas ao extrato de solo ou de planta. O anticorpo se liga com a bactéria específica tornando-a magnética. A seguir, este microrganismo será separado através do uso de um campo magnético. Existem vários procedimentos de acoplagem das partículas paramagnéticas (disponíveis comercialmente). Este

sistema tem a vantagem de enriquecer e concentrar a bactéria alvo facilmente. O outro sistema é baseado em partículas menores, onde o princípio básico é o mesmo, porém usa-se um campo magnético forte porque as partículas são menores. Neste caso pode-se apenas enriquecer mas não concentrar a amostra.

Este método foi usado em nosso laboratório para isolar *Azospirillum brasilense* do seu solo de origem (Km 47, Antiga Agrostologia, UFRRJ).

1. Marcação dos anticorpos:

- a. Bloquear os microtubos da marca Eppendorf (volume total de 1,5 ml) com solução BSA (3%) em PBS, esterilizada por filtração por 30 min. a 37°C. A seguir, descartar a solução.
- b. Lavar 170 µl de Dynabeads (DB) com 170 µl da solução de borato (0,05M; pH 9,5). Manter o microtubo Eppendorf no concentrador de partículas magnéticas (CPM) e remover o sobrenadante depois de 5 min.
- c. Ressuspender os DB em 85 µl da solução de borato 0,05M (concentração do DB: 20 mg/ml).
- d. Adicionar a solução de anticorpos (85 µl diluído em solução de borato 0,05M, de acordo com os testes de título do soro).
- e. Incubar durante a noite à temperatura ambiente, com rotação suave.
- f. Lavar 6 vezes com 170 µl de PBS utilizando-se do CPM por 5 min. em cada lavagem.
- g. Ressuspender em 170 µl de PBS.
- h. Para se avaliar a concentração de proteínas e a eficiência a ligação dos anticorpos aos dynabeads, deve-se fazer a leitura da densidade ótica a 280nm. O valor mínimo de proteína requerido deve ser maior que 0,1 mg ($D.O_{280} = 1$, corresponde a 0,8 mg de proteína).

* Solução de borato 0,05M (pH 9,5):

3,1 g de H_3BO_3 em 1 l de água destilada, ajustar o pH com NaOH.

2. Separação magnética (procedimento para enriquecimento):

- a. Bloquear os microtubos Eppendorf (volume total de 1,5 ml) com solução de BSA (3%) em PBS esterilizada por filtração por 30 min. a 37°C e descartar.
- b. Colocar de 200 a 400 µl do extrato do solo ou planta e adicionar 10 µl dos anticorpos ligados aos DB, agitar gentilmente.

- c. Incubar por 2 h à temperatura ambiente com rotação suave, tendo cuidado para que nenhuma gota permaneça nas paredes do microtubo.
- d. Colocar o microtubo Eppendorf no CPM e deixar por 5 min. até todas as partículas ficarem concentradas no lado magnético. Retirar o sobrenadante enquanto o microtubo ainda estiver no CPM.
- e. Retirar o microtubo Eppendorf do CPM e ressuspender em 400 µl de solução de lavagem (PBS 1/10 e 0,1% BSA).
- f. Repetir os passos D e E pelo menos 3 vezes.
- g. Para a caracterização das bactérias isoladas, colocar a fração que ficou retida no magneto sobre uma placa de Petri com meio seletivo de caracterização. Pode-se fazer diluições para que as colônias fiquem separadas na placa. Nesta fase final pode-se inocular as amostras no meio semi-sólido sem N, que permitirá o crescimento apenas das diazotróficas. A partir desta fase, executa-se o protocolo de identificação do organismo alvo. Para bactérias diazotróficas presentes em plantas não leguminosas usar os procedimentos descritos por Döbereiner et al., (1995)

3. Preparação das amostras de planta e solo.

- a. Após lavagem, macerar o material de planta ou solo em 5 ml de tampão estéril (1/10 PBS, 0,02% BSA).
- b. Esperar a sedimentação das partículas grosseiras por 15 min. e retirar o sobrenadante para enriquecimento imunomagnético.

Observações:

- * Todas as soluções devem ser esterilizadas.
- * Trabalhar em condições estéreis.
- * Não adicionar azida sódica aos anticorpos ligados aos DB.

4. OUTRAS TÉCNICAS DISPONÍVEIS

Outros métodos imunológicos estão a disposição para detectar, quantificar e localizar microorganismos no ambiente. Estes métodos não serão descritos em detalhe porque, nas nossas condições, os equipamentos ou o suprimento de materiais necessários não estão disponíveis. Entretanto vale citá-los.

a. Fluxo citométrico

Microrganismos (bactérias) marcadas com substâncias fluorescentes podem ser detectadas e quantificadas através de um feixe a laser. As células movem-se em fila única através deste laser onde são contadas, permitindo a análise automática de milhões de células em poucos minutos. Diferentes tubos podem ser arranjados para analisar diferentes parâmetros simultaneamente. As células também podem ser marcadas de forma diferencial com fluorocromos acoplados a anticorpos, sondas de oligonucleotídeos ou mesmo marcados diretamente com DAPI (4,6-diamidino-fenilindole) que se liga ao DNA da célula. As limitações são o alto custo do instrumento e o tamanho reduzido do organismo. É muito útil no monitoramento da introdução de microorganismos no ambiente e na investigação da microflora natural. É muito usado em sistemas aquáticos (Troussellier et al., 1993). Os números encontrados são inferiores aos da contagem direta, indicando falhas nas etapas de preparo das amostras na fase de desorção e desagregação dos microrganismos (Schloter et al., 1995).

b. Análise de imagens e utilização de câmeras de CCD (charge-coupled device)

A introdução de um sistema de processamento e análise de imagens melhorou o exame microscópico de organismos no ambiente natural ou nele introduzidos. Este benefício advém de um microscópio assistido por um computador acoplado a uma câmera de vídeo que permite ajustes de contraste, contagem de células por determinação do tamanho da célula alvo e determinação da biomassa através do uso de diferentes algoritmos (Caldwell et al., 1992; Sieracki et al., 1989). Estas câmeras trabalham a baixa temperatura (resfriadas a nitrogênio) com uma varredura lenta da imagem. A vantagem é que reduz o ruído térmico pelo resfriamento e o eletrônico pela leitura a baixa velocidade. A CCD consiste numa matriz de 385 por 578 pinos que são sensibilizados pela luz. As imagens são estocadas a cada 0,02s de exposição para campo claro (bright field) e após 15 a 30 min. por campo escuro (dark field). São mais acuradas que sistemas baseados em vídeo na detecção de sinais fracos de bactérias marcadas para fluorescência. Câmeras CCD tem sido usadas na detecção de bactérias modificadas no solo (Silcock et al., 1992) ou em material de planta (Shaw et al., 1992).

c. Radioimunoensaio

Neste caso são utilizados radioisótopos como marcadores que sensibilizam uma chapa fotográfica pela emissão do isótopo. Também pode ser usado um contador de cintilações que possibilita a comparação das amostras em termos quantitativos. A maior dificuldade reside no credenciamento do laboratório para uso e no fornecimento constante do isótopo e dependendo deste pode ter uma vida útil muito curta como é o caso do P^{32} . Outro fator é a emissão de radiação que pode causar danos pessoais e ambientais. São excelentes marcadores pois possuem baixo “background” e grande facilidade de uso, entretanto, estão sendo substituídos por outros que não causam danos a saúde.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com o resultado que se deseja alcançar, várias técnicas estão a disposição do usuário. A imunologia permite que o organismo seja detectado e identificado de forma precisa e direta. Entretanto, o maior limite ainda é o elevado número de células necessário para uma detecção positiva. Mas as perspectivas futuras estão mudando este enfoque já que os novos métodos desenvolvidos começam a combinar imunologia com biologia molecular. O uso de anticorpos recombinantes é o exemplo mais recente, mais que ainda está limitado pelo desenvolvimento de “primers” mais eficientes. Estes novos anticorpos que são produzidos em larga escala através do uso do DNA complementar também amplia o número de novas técnicas de detecção que certamente terão aplicação em ambientes naturais sem que o organismo não necessite nem de ser cultivado.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a colaboração da Sr^a Dorimar dos Santos Félix pela normalização das referências bibliográficas e a Dr^a Norma G. Rumjanek pela correção do texto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUNEL, B.; CLEYET-MAREL, J.L.; NORMAND, P., BARDIN, R. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.54, p.2636-2642, 1988.
- CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAWRENCE, J.R. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.12, p.1-67, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60p.
- HRANITZKY, K.W.; LARSON, A.D.; RAGSDALE, D.W.; SIEBELING, R.J. Isolation of serovars of *Vibrio cholerae* from water by serological specific method. **Science**, New York, v.10, p.1025-1026, 1980.
- LEA, T.; VARTDAL, F.; DAVIES, C.; UGLESTAD, J. Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, Copenhagen, v.22, p.207-216, 1985.
- LÜK, T. M.C.; LINDBERG, A.A. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assay. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.137, p.1-8, 1991.
- MAVINGUI, P.; BERGE, O.; HEULIN, T. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. **Symbiosis**, Rehovot, v. 9, p.215-221, 1990.
- MORGAN, J.A.W.; WINSTANLEY, C.; PICKUP, R.W.; SAUNDERS, J.R. Rapid immunocapture of *Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacterial flagella. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.57, p.503-509, 1991.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; ASSIS, J.R.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 11p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 30).
- SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnology Advances**, Elmsford, v.13, p.75-90, 1995.

- SHAW, J.J.; DANE, F.; GEIGER, D.; KLOEPPER, W. Use a bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.58, p. 267-273, 1992.
- SIERACKI, M.E.; REICHENBACH, S.E., WEBB, K.L. Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.55, p.2762-2772, 1989.
- SKJERVE, E.; ROVIK, L.M.; OLSVIK, Y. Detection of *Listeria monocytogenes* in food by immunomagnetic separation. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.56, p.3478-3481, 1990.
- SILCOCK, D.J.; WATERHOUSE, R.N.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I.; KILHAM, K. Detection of a single genetically modified bacterial cell in soil by using charge coupled device-enhanced microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.58, p.2444-2448, 1992.
- TROUSSELLIER, M.; COURTIES, C.; VAQUER, A. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. **Biology of the Cell**, Paris, v.78, p.111-121, 1993.
- VAN VUURDE, J.W. New approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. **EPPO Bulletin; European and Mediterranean Plant Protection Organization**, Paris, v.17, p.139-148, 1987.