



**ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA
Nitrospirillum amazonense ESTIRPE CBAmC EM AMOSTRA DE SOLO BASEADA
EM HIBRIDIZAÇÃO “*in situ*” FLUORESCENTE (“FISH”)**

Stefany Oliveira da Silva, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel;

Ana Luiza Trombini Tadielo, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel;

Maria Joana da Silva Correa Cesar, discente de graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

Julio Cesar Almeida Amaral, discente de graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

Cássia Regina Nespolo, docente, Universidade Federal do Pampa; Stefan Schwab, pesquisador, EMBRAPA Agrobiologia.

✉-mail primeiro autor- stefanysilva.aluno@unipampa.edu.br

Nitrospirillum amazonense, anteriormente *Azospirillum amazonense*, é uma bactéria fixadora de nitrogênio que apresenta potencial para promover o crescimento das plantas quando utilizada como inoculante. A estirpe CBAmC de *N. amazonense* foi isolada da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e atualmente é autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso comercial como inoculante (bioestimulante) na cultura daquela planta. O presente trabalho foi realizado durante o período de estágio curricular obrigatório do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, em casa-de-vegetação e laboratórios da Embrapa Agrobiologia que fica localizada na cidade de Seropédica / RJ. Esse estudo teve como objetivo estabelecer uma metodologia para detecção da estirpe CBAmC em amostra de solo baseada na técnica de hibridização “*in situ*” fluorescente (“FISH”). A metodologia estabelecida foi adaptada da literatura, com a otimização de alguns procedimentos e etapas específicas. Para estabelecimento da metodologia, foram utilizadas três condições de teste: 1) células puras da bactéria; 2) células da bactéria misturadas com solo; e 3) solo não adicionado da bactéria. Células da bactéria foram obtidas por cultivo em meio de cultura Dygs líquido (composto de 2,0g de ácido málico, 2,0g de glucose, 1,5g de peptona bacteriológica, 2,0g de extrato de levedura, 0,5g de fosfato de potássio monobásico, 0,5g de sulfato de magnésio e 1,5g de ácido glutâmico por litro), normalmente utilizado para o crescimento de bactérias diazotróficas, seguido de centrifugação a 13,9 g por 5 minutos, e descarte do sobrenadante. Foram utilizadas amostras de solo provenientes do campo experimental da Embrapa Agrobiologia. Essas amostras (0,25 g) eram transferidas para microtubos plásticos de 2 ml, contendo ou não células da bactéria, sendo depois adicionados 2 ml de solução de paraformaldeído a 3% tamponado com solução de fosfato (PBS 1x). Esses tubos foram agitados em vortex e incubados a 4°C durante 18h na horizontal. Após, foram adicionados 7 mg de polivinilpirrolidona (PVPP). Os tubos foram agitados horizontalmente a 300 rpm durante 20 minutos e deixados em repouso por 5 minutos para separar as maiores partículas de solo. Após, 1 ml do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo plástico de 2 ml sobre 1ml de uma solução de sacarose a 65%. As amostras foram centrifugadas a 16.438 g por 30min a 18 °C. 1800µl do sobrenadante foram coletados e filtrados através de uma membrana de 0,22 µm de porosidade. As membranas foram então transferidas para placas de Petri contendo papel absorvente, sendo sucessivamente desidratadas em etanol 50%, 80% e 100% por 6 min cada. As membranas desidratadas foram colocadas sobre lâminas de microscopia revestidas com graxa de silicone. Para a hibridização com a sonda específica para *N.*

amazonense, foram adicionados 340µl de uma solução de formamida 25%, 30µl de reagente bloqueador para hibridização e detecção de ácido nucleico para uso “in vitro” (Bloking reagent, cod.1096176, Boehringer mannheim GmbH Germany) e 70µl de solução da sonda Azama-7-639nm por lâmina. As amostras foram incubadas a 46 °C por 90 min. Os filtros foram lavados com tampão de lavagem 25% (Tris-HCl, NaCl, EDTA e SDS) pré-aquecido e incubados por 10 min a 48 °C, lavados com água destilada e deixados secar na bancada. O material hibridizado foi visualizado com o auxílio de um Microscópio Confocal de Varredura a Laser LSM700 (Zeiss). Foram visualizadas estruturas semelhantes a células bacterianas, indicando o potencial do método em detectar a bactéria *Nitrospirillum amazonense* estirpe CBAmC em amostra de solo. De modo estratégico, a metodologia estabelecida auxiliará as pesquisas para elucidar mais precisamente o modo e o local de ação do microrganismo, ao exercer seu efeito bioestimulador sobre a planta hospedeira da cana-de-açúcar, quando aplicado como inoculante.

Agradecimentos: UNIPAMPA, EMBRAPA AGROBIOLOGIA

Palavras-chave: *Nitrospirillum*; cana-de-açúcar; solos; FISH;