

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB



**TÉCNICAS MICROSCÓPICAS APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO  
DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E BIOMACROMOLÉCULAS EM  
TECIDOS VEGETAIS**

**CNPAB  
Seropédica, RJ  
Julho/1998**



Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à  
Embrapa-CNPAB  
Antiga Rodovia Rio/São Paulo  
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500  
Fax: (021)682-1230  
Caixa Postal 74505  
23851-970 Seropédica, RJ  
e-mail: agrob@cnps.embrapa.br

#### **Comitê de Publicações**

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

BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; SILVA, R.A. da; BALDANI, J.I.;  
DÖBEREINER, J. **Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e  
localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em  
tecidos vegetais.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, jul. 1998. 27p. (Embrapa-  
CNPAB. Documentos, 50).

1. Bactéria. 2. Fixação biológica de nitrogênio(FBN). 3. Tecido vegetal. I. Olivares,  
F.L., colab. II. Goi, S.R., colab. III. Silva, R.A., colab. IV. Baldani, J.I., colab. V.  
Döbereiner, J., colab. VI. Embrapa . Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia  
(Seropédica, RJ). VII. Título. VIII. Série.

CDD 579.3

© Embrapa

# SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO.....	5
3. PREPARO DE AMOSTRAS DE TECIDOS VEGETAIS PARA MICROSCOPIA.....	6
3.1. FIXADORES.....	7
3.2. RESINAS.....	8
3.3. CORANTES/CONTRASTANTES.....	9
3.4. ULTRAMICROTOMIA.....	9
4. APLICAÇÕES COM O MICROSCÓPIO DE LUZ.....	10
4.1. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.....	10
4.2. MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO, CONTRASTE DE FASE E INTERFERÊNCIA.....	11
4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	12
4.4. OUTRAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓTICA E VIDEO-MICROSCOPIA.....	13
5. APLICAÇÕES AO MICROSCOPIO ELETRÔNICO.....	13
6. A IMUNOLOGIA E A MICROSCOPIA.....	16
7. A BIOLOGIA MOLECULAR E A MICROSCOPIA.....	18
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
9. REFERÊNCIAS.....	22

# TÉCNICAS MICROSCÓPICAS APLICADAS NA IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E BIOMACROMOLÉCULAS EM TECIDOS VEGETAIS

V.L.D. Baldani<sup>1</sup>, F.L. Olivares<sup>2</sup>, S.R. Goi<sup>3</sup>, R.A. da Silva<sup>4</sup>, J.I. Baldani<sup>1</sup> & J. Döbereiner<sup>1</sup>

## 1. RESUMO

Nenhuma ferramenta científica contribuiu tanto para o avanço do conhecimento básico e mudança de paradigmas em ciência como a microscopia. As primeiras observações utilizando microscópios rudimentares datam do início do século XXVII, e desde então, com a evolução de instrumentos e técnicas, grande volume de informações morfológicas e ultraestruturais foram sendo acumuladas, contribuindo para o entendimento de muitos eventos biológicos. Este trabalho, acompanhando a evolução das técnicas em microscopia ótica e eletrônica, teve como objetivo relatar de forma sumária a gama de aplicações e contribuições da microscopia ao estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio, passando pelas técnicas descritivas mais básicas de microscopia ótica, envolvendo campo claro, contraste de fase e outras técnicas de contraste, bem como técnicas de coloração específica e inespecífica. Ainda dentro da microscopia descritiva, o uso da microscopia eletrônica na identificação e descrição ultraestrutural de bactérias diazotróficas. Por fim, são relatadas técnicas mais sofisticadas de imunologia e a biologia molecular, as quais capacitam o microscópio a gerar informações mais completas que a simples localização das bactérias no tecido vegetal, e envolvem o posicionamento taxonômico da bactéria *in situ*, detecção específica de uma estirpe específica dentro do complexo microbiano, detecção da expressão de genes e biomacromoléculas (enzimas, carboidratos) envolvidas

---

<sup>1</sup> Pesquisadores Ph.D., da Embrapa *Agrobiologia*, km 47, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ  
e-mail: [agrob@cnps.embrapa.br](mailto:agrob@cnps.embrapa.br)

<sup>2</sup> Bolsista da categoria Recém-Doutor do CNPq

<sup>3</sup> Professora Adjunta do Departamento de Ciências Ambientais da UFRRJ

<sup>4</sup> Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq

na interação diazotrófico-planta (p. ex. nitrogenase). Paralelo ao avanço na obtenção de conhecimento na área, avanços significativos na aquisição e processamento de imagens garantem o sucesso na qualidade das imagens documentadas.

## 2. INTRODUÇÃO

Desde sua invenção a cerca de quatrocentos anos atrás, o microscópio tem desempenhado um papel fundamental na exploração de amostras orgânicas e inorgânicas, tornando-se uma ferramenta indispensável na pesquisa científica. Ao longo deste período, com evolução do conhecimento científico básico em física ótica e a expansão dos campos de aplicação de microscopia nas áreas biológicas e de materiais, tanto no campo da microscopia ótica como na microscopia eletrônica foram desenvolvidos instrumentos cada vez mais poderosos, uma gama de técnicas de contraste, que aliadas ao surgimento de software e acessórios para processamento e análise de imagem, tornaram a microscopia uma ferramenta imprescindível na ciência moderna.

Muitas das técnicas microscópicas atualmente aplicadas na compreensão da interação entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio foram previamente desenvolvidas para resolução de problemas na área biomédica, sendo introduzidas no campo da microbiologia do solo com poucas modificações e grande sucesso. Atualmente, a microscopia caminha lado a lado com uma gama de técnicas imunológicas e de biologia molecular, o que amplia tremendamente as informações obtidas ao microscópio. O sucesso desta união de técnicas resulta na possibilidade de detecção específica da bactéria ou de seus componentes estruturais bem como componentes do tecido vegetal, enriquecendo sobremaneira as informações de morfologia e ultraestrutura. A detecção fundamentada em métodos imunológicos baseia-se na habilidade de anticorpos reconhecerem estruturas tridimensionais específicas (partes de proteínas ou polissacarídeos) de biomacromoléculas presentes na superfície ou citoplasma da bactéria. Já, a detecção baseada em métodos de biologia molecular é determinada pelo pareamento específico de fitas ácidos nucleicos com bases complementares.

Este trabalho tem como objetivo avaliar de forma sumária, a contribuição da microscopia *per si* ou associada a técnicas imunológicas e de biologia molecular para o

estudo de fitobactérias fixadoras de nitrogênio, procurando abordar dentro de uma seqüência cronológica, desde as técnicas mais simples, àquelas mais sofisticadas e de maior poder informativo.

### **3. PREPARO DE AMOSTRAS DE TECIDOS VEGETAIS PARA MICROSCOPIA**

Durante os primórdios do desenvolvimento do microscópio eletrônico (1930-1940), as observações eram limitadas a materiais muito pequenos ou naturalmente finos. Com a necessidade de maiores conhecimentos sobre o funcionamento e localização de organelas e compostos celulares, técnicas de preparo básico de materiais biológicos foram desenvolvidas, tais como fixação e ultramicrotomia.

Uma das primeiras técnicas de sucesso a revelar a estrutura celular foi a técnica de sombreamento, desenvolvida por Willians & Wyckoff (1946) que consiste na cobertura da amostra em estudo, com metais pesados ou de alta densidade como o urânio, ouro ou paládio. Esta técnica foi primeiramente utilizada para a observação de cloroplastos isolados e para a visualização de microfibrilas de celulose da parede celular de células vegetais. Ainda hoje tem sido aplicada nos estudos da geometria dos ácidos nucleicos.

A partir do final da década de 50 e início dos anos 60, após diversos trabalhos pioneiros, os procedimentos de preparação de amostras biológica para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram relativamente padronizados, com etapas básicas de fixação, desidratação, embebimento e polimerização em resinas acrílicas, obtenção de cortes ao ultramicrótomo e contrastação com metais pesados. Entretanto, todas estas etapas são variáveis, sendo recomendável ajuste das técnicas para cada material a ser estudado. Só para se ter uma idéia, todas as soluções fixadoras utilizadas em microscopia tem efeito na morfologia celular, por exemplo, bactérias fixadas em tetróxido de ósmio apresentam nucléolo fibrilar (Kellenberger et al.; 1958), enquanto que, se fixada em glutaraldeído e depois em tetróxido de ósmio o nucléolo estará condensado ou coagulado (Holt & Beveridge, 1982). A seguir é feito um breve comentário sobre as principais etapas envolvidas na preparação de amostras biológicas para MET.

### 3.1. FIXADORES

A função da solução fixadora é imobilizar a estrutura celular o mais próximo do estado natural e funcional da célula/tecido, paralisando o metabolismo celular e impedindo o ataque microbiano. Um fixador deve criar várias ligações estáveis e ter a capacidade de penetrar rapidamente no material em estudo. Uma seqüência de fixação bastante aceita para células vegetais, com boa preservação ultraestrutural consta da fixação primária com o aldeído glutárico, que fixa principalmente proteínas pelo estabelecimento de ligações divalentes com grupamentos amino, seguida de pós-fixação em tetróxido de ósmio, que reage com os lipídeos (Woldringh, 1973).

#### ***Glutaraldeído***

Fixador primário mais utilizado pelos citologistas por proporcionar uma fixação mais completa da estrutura celular, especialmente das proteínas. Este fixador pode ser utilizado sozinho ou em mistura com outros fixadores, sendo diluído em concentrações que variam de 1- 10% em soluções tampões (por ex. cacodilato e fosfato), resultando numa melhor preservação das estruturas celulares e oferecendo um maior contraste microscópico. Entretanto, quando usado em técnicas imunológicas, este fixador pode diminuir ou eliminar o reconhecimento de proteínas por causar danos estruturais a determinantes antigênicos (Glauert & Thornley, 1966).

#### ***Paraformaldeído***

Fixador primário utilizado na preservação de estruturas celulares. Reage em ligação monovalente com os grupos aminos de proteínas, não sendo tão eficiente na estabilização de proteínas quanto o glutaraldeído, desse modo não sendo recomendável para estudos estruturais finos. Porém, não tem ação deletéria sobre os determinantes antigênico da amostra, permitindo a realização de ensaios de imunocitoquímica.

#### ***Tetróxido de ósmio***

Utilizado como fixador secundário. Entretanto, seu efeito oxidativo drástico pode destruir muitas das enzimas celulares. Em reação de imunocitoquímica, a pós-fixação em ósmio é freqüentemente omitida por causar substancial redução no reconhecimento do



anticorpo, tendo em vista a destruição da estrutura terciária das proteínas. O ósmio se liga covalentemente com os determinantes antigênicos, impedindo o reconhecimento antígeno-anticorpo. É muito utilizado em MET devido seu poder de preservação da integridade da membrana plasmática da célula e das organelas.

### **3.2. RESINAS**

Utilizadas como meio de inclusão das estruturas fixadas, dando sustentação e rigidez para obtenção dos cortes semi e ultra finos.

#### ***Epoxy***

Resina plástica de polimerização a quente. Sob nomes comerciais de Epon e Araldite são importantes na preparação dos cortes finos, por permitir a preservação estrutural do material e serem extremamente estáveis sob ação do feixe de elétrons. Entretanto, a natureza hidrofóbica dessas resinas afeta a preservação antigênica do material, causando diminuição dos sinais de marcação. Estas resinas apresentam boa infiltração celular e reagem bem com os corantes de metais pesados (Vanden Bosch, 1986). A resina epon mais utilizada em MET tem nome comercial de Spurr, tendo em vista sua baixa viscosidade, apresenta bom poder de infiltração, sendo a resina que produz os melhores resultados de preservação estrutural, á despeito de sua elevada toxicidade.

#### ***Lowicryl***

Resina de natureza hidrofílica, oriunda de misturas de acrilatos e metacrilatos de baixa viscosidade. Esta resina foi introduzida por Roth et al. (1981) para permitir maior infiltração e polimerização em temperaturas baixas, evitando assim o calor que é necessário à cura das resinas a base de Epoxy, o qual é prejudicial a alta retenção da reação antigênica. Entretanto, esta não é muito utilizada na prática devido a dificuldade de penetração em alguns tecidos vegetais, dificultando assim os cortes do material (Ashford et al. 1986).

### ***London L.R.White***

Resina acrílica aromática, hidrofílica, a base de metacrilato, e que apresenta alta retenção do antígeno, baixo “background”, sendo utilizada para obtenção de cortes tanto em microscopia ótica e eletrônica, sendo de fácil infiltração em tecido vegetal. Esta resina foi primeiramente utilizada por Craig & Miller (1984) em estudos imunológicos para a detecção de proteínas em sementes de ervilha, assim como em outros estudos.

### **3.3. CORANTES/CONTRASTANTES**

Utilizados para aumentar o contraste das estruturas celulares, que é pobre em cortes semi e ultra-finos de estruturas quimicamente fixadas. Para microscopia ótica utiliza-se normalmente corantes orgânicos, como por exemplo o azul de toluidina, que cora inespecificamente sítios com cargas negativas. Para MET, normalmente utiliza-se corantes à base de metais pesados como por exemplo, acetato de uranila, citrato de chumbo, ouro, platina, ácido fosfotungístico (PTA) etc. que facilitam a visualização morfológica dos componentes celulares.

Os corantes podem variar de acordo com o objetivo de estudo. Para espécimes pequenas ou em solução, como no caso de visualização de flagelo, células em suspensão ou lisados celulares, utiliza-se a coloração negativa. Esta coloração ocorre quando os metais utilizados nos corantes (acetato de uranila, PTA etc.) são depositados em volta da espécimen. A coloração positiva é a mais utilizada em microscopia eletrônica pois permite que o metal dos corantes utilizados como o ósmio, acetato de uranila, citrato de chumbo, ouro, etc., depositem-se diretamente sobre a espécimen (Reynolds, 1963). Esses metais, complexam-se fortemente com o espécimen aumentando a visualização e contraste das organelas (ribossomos e material nuclear) ou compostos celulares (proteínas, grãos de amido, etc.).

### **3.4. ULTRAMICROTOMIA**

Os cortes semi-finos são necessários para uma triagem do material antes da visualização ao microscópio eletrônico. Esses cortes são feitos em ultramicrotomo utilizando-se facas de vidro, colocados em lâminas sob água, secos em chapa quente, e corados normalmente em azul de toluidina. Após essa triagem, troca-se a espessura de

corte de 1 $\mu$ m para 50-70 nm (cortes ultrafinos) utilizando-se facas de vidro ou de forma preferencial, facas de diamante. Esses cortes são coletados usualmente em grades de cobre cobertas com formvar, carbono ou colodium e vistos diretamente em microscópio eletrônico. O tamanho e forma dos grades variam de acordo com o fabricante.

## 4. APLICAÇÕES COM O MICROSCÓPIO DE LUZ

### 4.1. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Técnica amplamente usada em microscopia, a qual baseia-se na observação de espécimes corados sob campo de iluminação uniforme. Muito utilizada no campo de anatomia vegetal para coloração geral ou específica de componentes celulares. Na identificação de bactérias diazotróficas, podemos citar a coloração de gram para separação das bactérias em gram positivas e negativas, método empírico de coloração diferencial que reflete diferenças na constituição da parede celular das bactérias.

Um grande número de corantes tem sido aplicados em amostras vegetais não-fixadas para revelação da anatomia do tecido e localização de bactérias diazotróficas. De modo geral tais corantes não apresentam especificidade para coloração de bactérias, reagindo com sítios basófilos ou acidófilos presentes no vegetal e no microrganismo. O mesmo é válido para o caso de seções semi finas (1-2  $\mu$ m) de tecidos vegetais fixados em glutaraldeído-tetróxido de ósmio e embebidas em resinas plásticas, as quais são ordinariamente coradas com corantes básicos como por exemplo, azul de toluidina e observadas em campo claro para visualização de bactérias. Tal procedimento foi adotado por Baldani (1996) e Olivares (1997) na descrição do processo de infecção e estabelecimento endofítico de bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*, respectivamente em plantas de arroz (*Oriza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum hib.*).

Ainda não existem corantes com afinidade específica para bactérias colonizando tecidos vegetais, a despeito das tentativas de diversos pesquisadores neste campo. Trabalhando com sais de tetrazólio como corante vital, Patriquin & Döbereiner (1978) localizaram colônias de *Azospirillum brasilense* no interior de vasos de protoxilema de raízes de milho (*Zea mays*) através da visualização de cristais de formazona (complexo

de cor vermelha), formados em função da redução do sal. Tal método foi bastante criticado pela comunidade científica, visto que qualquer sítio biológico de oxidação-redução é capaz de reduzir este sal.

Além da visualização de bactérias isoladas ou em associação com a planta hospedeira, diversas biomacromoléculas ou mesmo eventos celulares ligados ao estabelecimento da interação entre o microrganismo diazotrófico e a planta hospedeira tem sido investigados utilizando a microscopia de luz e corantes de diferentes graus de especificidade a moléculas alvo. Como bom exemplo, podemos citar Dudley et al. (1987). Neste trabalho os autores interessados em estudar os eventos iniciais da simbiose entre raízes de alfafa (*Medicago sativa*) e *Rhizobium meliloti*, utilizaram técnicas de clareamento do tecido vegetal, seguido de coloração com hematoxilina para visualização de pontos de indução mitótica em segmentos de raízes ao microscópio de luz. O método desenvolvido mostrou-se bastante útil na visualização dos eventos de superfície e das camadas mais externas das células do córtex radicular, corando cordões de infecção e o citoplasma granular de células em processo de diferenciação.

#### **4.2. MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO, CONTRASTE DE FASE E INTERFERÊNCIA**

Campo escuro, contraste de fase e de interferência são técnicas óticas de contraste que tem como principal vantagem, a possibilidade de observação das preparações *in vivo* com clareza sem a necessidade de fixação e coloração das células, o que poderia trazer alterações morfológicas ao espécime. A microscopia de contraste de fase é fundamental na observação da morfologia e motilidade de bactéria, sendo por exemplo no caso do gênero *Azospirillum*, uma ferramenta importante na distinção prévia de estirpes ao nível de espécie (Döbereiner et al. 1995). A microscopia de campo escuro prioriza o aumento de contraste com perda significativa de resolução, sendo mais indicada para visualização de estruturas lineares como por exemplo flagelos. Já o contraste de interferência, facilita na interpretação morfológica, gerando imagens em três dimensões. As técnicas de campo escuro e contraste de interferência parecem não ser prescindíveis em estudos envolvendo bactérias diazotróficas. A apresentação de fotomicrografias em trabalhos científicos muitas vezes tem caráter de ilustração complementar a uma informação obtida em campo claro.

### 4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Esta técnica baseia-se no uso de corantes fluorescentes ou fluorocromos para visualização do espécime. Estes se ligam a componentes da célula microbiana ( p. ex. ácidos nucleícos) e sob excitação ultravioleta ou radiação eletromagnética na faixa do visível de baixo comprimento de onda, emitem radiação com comprimento de onda superior à radiação incidente. A grande vantagem desta técnica é o ganho de contraste, porém requer custo adicional com aquisição de equipamentos. No campo da microbiologia, corantes fluorescentes tem papel relevante na contagem direta de bactérias no meio ambiente, dentre os fluorocromos mais utilizados estão “acridine orange” (3,6 – bis [dimethylamino] acridinium chloride [AO] e “DAPI” 4', 6'- diamidino – 2 - phenylindole (Kepre Jr. & Pratt, 1994). Seu potencial de uso tem sido amplificado pelo surgimento contínuo de novos fluorocromos e ou combinação de técnicas. Recentemente, Chan et al. (1996) introduziram uma nova família de fluorocromos não tóxicos para aplicações microbiológicas, com uso na expressão da viabilidade de células, contagem acoplada a fluxo citométrico e estudos morfológicos.

Não existem na literatura muitos trabalhos utilizando fluorocromos para coloração direta de microrganismos diazotróficos, tendo em vista problemas ligados a especificidade dos fluorocromos e de autofluorescência, concentrando uma gama maior de trabalhos em fluorocromos combinados a anticorpos (ver tópico 6). Scheirer & Brasell (1984) utilizaram o microscopia epifluorescente para estudar algas cianofícias fixadoras de nitrogênio associadas com a briófito *Funaria hygrometrica*.

Estudos histoquímicos utilizando fluorescência podem ser exemplificados pelos trabalhos de Berry & McCully (1990) que utilizando azul de anilina, demonstraram a presença de depósitos de calose em papilas formadas em pêlos radiculares de plantas de *Alnus rubra*, desenvolvidas nos estágios iniciais da infecção por actinomicetos fixadores de nitrogênio do gênero *Frankia* e de Dudley et al. (1987) utilizando acridina orange e DAPI para detecção de figuras mitóticas na interação rizóbio e leguminosa.

#### 4.4. OUTRAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓTICA E VIDEO-MICROSCOPIA

A combinação de diversas técnicas de microscopia de luz amplia sobremaneira a gama de informações obtidas ao microscópio no estudo da interação entre diazotróficos e plantas. O uso de técnicas complementares ganhou aliados importantes, o computador e a câmera de vídeo. A partir de sua aquisição, diversos softwares presentes no mercado impõem tratamento matemático à imagem, corrigindo e interpretando esta como um todo ou atributos selecionados, gerando um grande número de informações sobre imagem, tais como separação, classificação e contagem de atributos, dados morfométricos e outros. Utilizando microscopia de campo claro, contraste de fase, polarização, fluorescência e a avaliação de imagens adquiridas por vídeo microscopia, Dazzo et al. (1996) examinaram o papel de glicolipídeos secretados por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* no desenvolvimento de pêlos radiculares de trevo branco. As alterações na arquitetura cristalina na parede celular do pêlo radicular, na modulação da diferenciação e dinâmica de crescimento de pêlos só foram bem documentadas pelos pesquisadores em função da avaliação das imagens em vídeo, as quais foram hábeis para detectar as variações estruturais em função do tempo. Apesar do potencial destas técnicas combinadas, poucas aplicações tem sido relatadas.

Outro exemplo de microscopia aliada ao computador resulta de técnicas de reconstrução. A partir de cortes seriados representativos obtidos ao longo do eixo de uma determinada estrutura, é possível sua reconstrução tridimensional assistida por computador, como foi feito por Tsuprun et al. (1990) com a subunidade MoFe proteína da nitrogenase e por Bingle et al. (1988) para a superfície das células, ambos de *Azotobacter vinelandii*.

#### 5. APLICAÇÕES AO MICROSCOPIO ELETRÔNICO

Com o estabelecimento do microscópio eletrônico como ferramenta científica, os microbiologistas ampliaram seu potencial de percepção de detalhes estruturais, previamente limitados pelo comprimento de onda da luz visível. O microscópio eletrônico de transmissão (MET) convencional, tem se constituído numa ferramenta valiosa para interpretação ultraestrutural da relação entre bactérias diazotróficas e a planta hospedeira.

Só para citar a interação rizóbio-leguminosa, grande parte descritiva envolvendo o processo de infecção e a morfologia de nódulos foi pautada na interpretação de fotomicrografias de MET (Dart, 1977; Faria et al. 1986; Faria, 1988; Goi et al. 1997).

No caso do MET, seções ultrafinas do espécime são necessárias para que o feixe de elétrons atravesse a amostra e uma imagem seja formada. Com desenvolvimento do microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras grossas puderam ser utilizadas. Neste caso, amostras fixadas quimicamente como descrito anteriormente, são desidratadas, secas no aparelho de ponto crítico de secagem e cobertas como um metal condutor (p. ex. ouro). Diferente do MET, no microscópio eletrônico de varredura, o feixe de elétrons não atravessa a amostra, interagindo com a superfície da amostra e gerando elétrons secundários e retroespalhados, que são coletados, amplificados e geram uma imagem em 3 dimensões em um tubo de raios catódicos. Embora a resolução usualmente obtida com MEV não ser comparada com a do MET, esta apresenta como vantagem a grande profundidade de foco.

O microscópio eletrônico de varredura tem sido utilizado com grande vantagem na descrição da forma geral e de detalhes de superfície da célula bacteriana, nas interações envolvendo bactéria-plantas (Levanony & Bashan, 1989; Reis Jr. et al. 1995). Kimura et al. (1989) localizaram bactérias no rizoplane de arroz utilizando a microscopia eletrônica de varredura, já Toledo et al. (1995) estudaram a localização de cianobactérias em pneumatóforos de plantas de mangue preto. Estudos de adesão de bactérias diazotróficas são bastante facilitados pelo uso do MEV, tendo em vista o poder de resolução do microscópio e a interpretação de imagens tridimensionais. Utilizando o MEV vários pesquisadores descreveram o modo de adesão de bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes, Levanony & Bashan (1989) avaliaram a adesão de *A. brasilense* estirpe Cd em raízes de trigo (*Triticum aestivum*), Reinhold et al. (1986) estudaram *Azoarcus* em Kallar grass (*Leucocephala fusca*) e James et al. (1994) avaliaram *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* híbrido). Recentemente, Olivares (1997) avaliou a interação entre as raízes de cana-de-açúcar micropropagadas e *Herbaspirillum*, estudando a adesão em diferentes seguimentos ao longo do eixo radicular.

Outras técnicas de microscopia eletrônica ainda pouco aplicadas ao campo das bactérias diazotróficas incluem a microscopia eletrônica de alta voltagem, que a despeito

de ganhos na investigação biológica ultraestrutural caracterizados pelo aumento na capacidade de penetração através da amostra (não são necessárias amostras ultrafinas), grande poder de resolução e redução significativa das aberrações cromáticas, apresentam elevado custo de aquisição e operação.

Microscópios conjugados de varredura e transmissão equipados com diferentes detetores de sinais gerados pela interação entre o feixe de elétron e espécime possibilitaram a introdução da microscopia analítica. Neste caso, na interação entre um feixe estreito de elétrons varridos e a amostra são gerados elétrons transmitidos por colisão elástica e inelástica, elétrons primários e secundários retroespalhados e raios-X, dentre outros sinais, que são coletados e interpretados convenientemente. Cada sinal contém uma informação peculiar sobre a natureza da amostra, que podem ser registradas de forma combinada ou não em um tubo de raios catódicos. Desse modo, a imagem de uma dada região da amostra pode ser visualizada na tela, ao mesmo tempo que um detetor de raios-X registra qualitativamente e quantitativamente a distribuição de elementos. A microanálise de raios-X (EDX) pode estar associada ao MEV e MET e é sensível para elementos com número atômico superior a 11, enquanto que a espectroscopia de perda de energia de elétrons (a qual é sensível para elementos atômicos mais leves com  $z = 3$  a 11), só pode ser utilizada na MET, já que necessita de cortes extremamente finos.

A adesão de *Azospirillum brasilense* a diferentes superfícies foi investigada utilizando por Dufrêne et al. (1996). A morfologia celular e produção de material extracelular foram visualizadas ao MEV, e em paralelo a composição química das células bacterianas e do material fibrilar extracelular avaliados por microanálise de raios-X. A microanálise de elementos de áreas selecionadas *in situ* promete causar verdadeira revolução na aquisição de informações ao microscópio, podendo ser uma ferramenta importante na detecção e dinâmica de elementos químicos nas interfaces de troca entre simbioses diazotróficas, além de inúmeras aplicações em outros campos nesta área. Com o advento das técnicas de microanálise, técnicas de criofixação ganharam mais campo, tendo em vista a necessidade de preservação dos componentes iônicos e biomacromoléculas dissolvidas no citoplasma da célula. Desse modo, como alternativa a fixação química, surgiram técnicas de congelamento rápido e preservação criogênica,



dentre as quais temos “freeze-drying”, “freeze-substitution (Pease, 1973). Utilizando um “cryoscanning microscopy” equipado com detetor EDS, Dong et al. (1994) determinaram a concentração de sacarose a partir da concentração de carbono como descrito por Huang et al. (1994) e observaram células bacterianas nos espaços intercelulares de células de parênquima cortical de colmos de cana-de-açúcar, as quais alegaram ser do *Acetobacter diazotrophicus*.

No campo da microscopia de alta resolução, detalhes ultraestruturais mais finos podem surgir a partir de imagens obtidas por microscópios de varredura de força atômica (Fendorf et al. 1997).

## **6. A IMUNOLOGIA E A MICROSCOPIA**

A necessidade de localização específica de microrganismos e compostos dentro da célula ou tecido vegetal, tem requerido o desenvolvimento de novas técnicas que na última década avançaram bastante. Os métodos de detecção imunológica são baseados no reconhecimento específico de um determinado antígeno pelo anticorpo produzido. Anticorpos monoclonais são produzidos “in vitro” por técnica de cultivo celular, e produzem uma população de anticorpos específica para um único sítio antigênico. Já, anticorpos policlonais são produzidos através da imunização de cobaias, e constituem-se de uma mistura de populações de anticorpos policlonais contra diferentes determinantes antigênicos.

A combinação de ferramentas imunológicas com técnicas de anatomia vegetal e microscopia ótica e eletrônica podem revelar detalhes precisos da interação planta-bactéria. Desse modo, utilizando anticorpos específicos podemos identificar um dado microrganismo, ou mesmo biomacromoléculas importantes na interação. Uma das primeiras técnicas utilizando anticorpos e a microscopia para estudar bactérias diazotróficas foi a imunofluorescência. Esta técnica baseia-se na combinação de anticorpos a fluorocromos e observação da formação de um sinal na faixa do visível em amostras levadas ao microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. A técnica é favorecida pela sensibilidade e especificidade das reações antígeno-anticorpo, aliada a

precisão e contraste das observações fornecidas pela microscopia ótica de fluorescência (Dien et al. 1977; Schank et al., 1979).

A Técnica de imuno-ouro combinada com o microscópio eletrônico de transmissão (MET) apresenta grande potencial de informação e deveria ser mais explorada nestes estudos, já que congrega o elevado poder de resolução do MET e a fácil visualização e precisão da imuno-localização utilizando partículas de ouro como marcador eletro-opaco. Um dos estudos pioneiros neste sentido, envolveu a identificação da bactéria fitopatogênica *Erwinia amylovora* (Van Laere et al. 1985). Levanony et al. (1989) utilizaram esta técnica para localização e identificação de *Azospirillum brasilense* estirpe Cd na superfície e no interior de raízes de trigo (*Triticum aestivum*) em dois sistemas de cultivo, axênico e não axênico. Como discutido acima, estruturas sub-celulares podem também ser localizadas através desta técnica; James et al. (1991) identificaram, localizaram e quantificaram glicoproteínas envolvidas no controle da difusão de oxigênio para o interior de nódulos de uma leguminosa aquática do gênero *Neptunia*, neste caso utilizando anticorpos monoclonais. Moens et al. (1995) demonstraram a natureza glicoproteica da proteína flagelina, presente no flagelo de *A. brasilense* estirpe Sp7 utilizando MET e imunomarcagem. A enzima chave no processo de fixação biológica de nitrogênio, a nitrogenase, foi imuno-localizada em plantas de arroz (*Oriza sativa*) e Kallar grass (*Leptochloa fusca*) inoculadas com a bactéria diazotrófica *Azoarcus* estirpe BH2, utilizando um anticorpo policlonal produzido contra a sub-unidade dinitrogenase redutase obtida de *Rhodospirillum rubrum* (Hurek et al. 1991). De modo similar, Olivares (1997) localizou a enzima em microcolônias de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo foliar de cana-de-açúcar var. B-4362.

Todos estes trabalhos combinam o alto poder de resolução das imagens ao MET com a detecção específica e até certo ponto semi-quantitativa dos ensaios de imunomarcagem com ouro. No entanto, em laboratórios não equipados com microscópio eletrônico de transmissão, a técnica de imuno-ouro ganha mais uma etapa, sendo acoplada a amplificação do sinal com íons de prata que permitem a visualização dos resultados ao microscópio ótico (Danscher, 1981; Danscher & Norgaard, 1983). Vanden Bosch (1986) estudando o metabolismo do nitrogênio em nódulos de soja (*Glycine max*), utilizaram esta técnica para detecção da enzima uricase. Reinhold & Hurek (1988)

interessados em entender o processo de infecção de raízes de plantas de Kallar grass por estirpes de *Azoarcus*, utilizaram a imunomarcagem com ouro e amplificação com prata em seções semi-finas preparadas para microscopia ótica, ressaltando as seguintes vantagens desta técnica com relação a imunofluorescência: (a) ausência de problemas com autofluorescência, (b) necessidade de microscópio equipado com sistema fluorescência.

## 7. A BIOLOGIA MOLECULAR E A MICROSCOPIA

A introdução de técnicas de biologia molecular acopladas às observações ao microscópio, ampliaram sobremaneira o volume de informações adquiridas nestes estudos. O uso de sondas de oligonucleotídeos complementares, construídas a partir a sequências específicas de diferentes sub-unidades (5S, 16S ou 23S) do RNA ribossômico (r-RNA), marcadas com fluorocromos ou compostos radioativos, além de permitir a detecção específica de bactéria e a expressão de genes específicos *in situ*, refletem também a atividade fisiológica e a afiliação filogenética, respectivamente como função da intensidade do sinal de fluorescência e especificidade da sonda utilizada (p. ex. sonda gênero, espécie, estirpe-específicas).

Nas técnicas de hibridização *in situ*, sítios de transcrição de genes específicos são localizados utilizando sondas de RNA marcadas para o gene de interesse. Temple et al. (1995) utilizaram esta técnica para estudar a distribuição dos genes estruturais da glutamina sintetase vegetal (enzima responsável pela assimilação do amônio fixado nos nódulos) em seções longitudinais através de nódulos de alfafa (*Medicago sativa*). Os autores, baseados nos resultados de hibridização *in situ* e observação morfológica ao microscópio de campo claro e escuro de nódulos em diferentes fases de sua ontogênese, foram capazes de localizar com precisão o transcrito ao nível celular e relacionar a expressão da GS com um estágio particular do desenvolvimento do nódulo. A hibridização *in situ* acoplada ao exame ao microscópio ótico tem sido usada para estudar o padrão de expressão de muitos genes envolvidos na interação simbiótica entre rizóbio e leguminosas, tais como genes estruturais da leghemoglobina (De Billy et al. 1991), nodulinas (Allen et al. 1991), hidrogenase e nitrogenase (Brito et al. 1995).

Utilizando sondas de oligonucleotídeos r-RNA complementares a uma região específica da sub-unidade 23S do r-RNA de *Azospirillum brasilense*, marcada com o fluorocromos “texas red”, Aβmus et al. (1997) monitoraram a infecção e colonização de raízes de trigo (*Triticum aestivum*) por *A. brasilense* utilizando o microscópio epifluorescente. Ainda neste trabalho, os autores utilizaram uma nova técnica microscópica para monitorar o sinal fluorescente oriundo da bactéria associada às raízes de trigo, a microscopia confocal. Esta, comparada à fluorescência convencional, apresenta as seguintes vantagens: (a) elimina efeitos de autofluorescência (baixo “background”), (b) problemas de área de foco limitada, gerando diferentes planos focais (obtenção de seções óticas completamente em foco, posteriormente combinadas, formando imagem 3-D). De forma resumida, o microscópio confocal se caracteriza pela geração de um feixe de laser que ilumina a amostra como um ponto luminoso de diâmetro bem reduzido e uma abertura que o permite a passagem e a detecção do sinal em foco, gerado pela interação do laser com a amostra, e a eliminação do sinal fora de foco. O instrumento utiliza “softwares” que processam rotineiramente a imagem, tão bem como a habilidade para reconstruir um objeto tridimensionalmente, que foi analisado por uma série de seções óticas. Com a microscopia confocal foram introduzidos sistemas de processamento de imagens assistidos por computador, que asseguram uma qualidade elevada de imagem, permitindo uma análise de alta resolução da distribuição espacial da bactéria na rizosfera.

Cabe ressaltar, que além da possibilidade de definir a posição taxonômica da bactéria baseada na hibridização com sondas específicas, a intensidade do sinal pode refletir a atividade fisiológica do microrganismo. De sorte que, baixa atividade fisiológica, reflete baixo conteúdo de ribossomos e por consequência sinal fluorescente fraco.

Um trabalho de excelente nível, que reflete bem o vasto potencial e a importância da combinação de técnicas, combinou anticorpos monoclonais e oligonucleotídeos fluorescentes utilizados simultaneamente para identificação *in situ* de bactérias em cultura mista e na rizosfera de plantas inoculadas. A contra-coloração foi realizada com DAPI e as imagens adquiridas por microscopia de epifluorescência e microscopia confocal com câmeras CCD (Aβmus et al. 1997). Esta combinação pode ser

aplicada para o monitoramento de dois microrganismos (por exemplo duas estirpes de uma mesma espécie) em relação a microbiota total em comunidades naturais, como foi feito por estes autores na distinção de *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Azospirillum brasilense* em cultura mista ou *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* estirpes Sp7 e Wa3 em raízes inoculadas de trigo em meio natural. Estudos de caráter estrutural e funcional dentro das comunidades microbianas podem ser elucidados pelo uso de sondas de nucleotídeos marcadas contra genes estruturais e anticorpos contra superfícies expostas ou enzimas citoplasmáticas. As novas técnicas de imagem, tal como microscopia confocal e o processamento de imagens, complementam com sucesso esta ferramenta (Hahn et al. 1993).

Além das técnicas sorológicas e da utilização de sondas de oligonucleotídeos marcadas com fluorocromos já discutidas, marcadores genéticos introduzidos em bactérias podem facilitar sobremaneira seu monitoramento ou de genes/metabólitos específicos em interação com a planta hospedeira. Dentre os marcadores genéticos mais utilizados estão os genes da luciferase *lux* (genes de bioluminescência de *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Xenorhabdus luminescens* ou *Photobacterium leiognathi*), genes *gusA* (oriundos da  $\beta$ -glucuronidase de *Escherichia coli*, o qual oxida “X-5-chloro-4-bromo-3-indolyl glucuronide” GlcA) e gene *lacZ* (oriundo da  $\beta$ -glucuronidase, o qual oxida “5-bromo-4-chloro-3-indolyl -  $\beta$ -D-galactopiranosidase” X-Gal), e mais recentemente os genes *gfp* (“green fluorescent protein”), isolado de *Aequorea victoria* (Wilson 1991).

Inúmeros trabalhos envolvendo a localização específica de bactérias diazotróficas tem sido relatados utilizando sistemas genéticos de marcação de bactérias. *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7 carregando uma fusão *lacZ*, foi facilmente localizado na superfície e nas células do córtex radicular de raízes de trigo (*Triticum aestivum*), após incubação e coloração específica *in situ* com X-Gal como substrato cromogênico e exame ao microscópio de luz (Arsène et al. 1994). Neste mesmo trabalho, a expressão de genes *nif* (genes estruturais da nitrogenase) foi também monitorada.

Devido a ausência de atividade GUS em plantas e muitas bactérias associadas a plantas, este marcador genético apresenta vantagens em relação ao anterior. Wilson et al. (1995) enumerou uma série de aplicações ao estudo da associação simbiótica entre

rizóbio e espécies de leguminosas, acopladas à microscopia, as quais incluem estudos ecológicos comparativos entre estirpes envolvendo sobrevivência no solo, competitividade por sítios de infecção e nodulação na planta, análise da regulação da expressão gênica e localização espacial de bactérias. De forma similar ao *lacZ*, os ensaios histoquímicos GUS, consistem na imersão dos tecidos em tampão contendo o substrato apropriado e desenvolvimento de cor azul espacialmente restrita a localização específica da bactéria em diferentes estágios de sua interação com a planta, passando da adesão ao rizoplano e estabelecimento endofítico como demonstrado nos trabalhos de Hurek et al. (1994) para *Azoarcus* sp. em raízes de gramíneas e Chirstiansen-Weninger & Vanderleyden (1993) para mutantes excretoras de amônio de *A. brasilense* em raízes de milho (*Zea mays*).

Mais recentemente o marcador genético GFP (“green fluorescent protein”) foi introduzido como o mais promissor sistema marcador para estudos de monitoramento de bactérias em diferentes ambientes e principalmente estudos *in situ*. Diferentemente do GUS e LacZ, a GFP requer apenas irradiância na faixa do azul, não sendo necessária adição de substrato. A fluorescência persiste mesmo após fixação da amostra, permitindo também estudar a sua expressão em amostras convencionadas preparadas para microscopia. O produto do gene *gfp* foi utilizado para estudos de expressão de genes específicos e localização sub-celular de proteínas ligadas a diferentes estágios de esporulação de *Bacillus subtilis* ao microscópio epifluorescente, com a proteína sendo prontamente detectada e seu sítio de síntese corretamente localizado (Lewis & Errington, 1996). Apesar do seu potencial, estudos aplicados a bactérias diazotróficas não foram publicados.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Técnicas e instrumentos em microscopia tem sido desenvolvidos a uma velocidade muito grande. Estas incluem a microscopia ótica de alta resolução e ME de força atômica. Com o refinamento do instrumental e das técnicas, ampliou-se sobremaneira a capacidade do microscópio em gerar informações. Além de suas funções básicas no campo puramente descritivo ou morfológico, aliada as técnicas imunológicas e

de biologia molecular, biomacromoléculas podem ser rastreadas e quantificadas em preparações fixadas ou mesmo *in situ*.

Mais recentemente uma gama de técnicas analíticas tem sido introduzidas, dentre as quais destaca-se a microanálise de raios X e a espectroscopia de perda de energia de elétrons, as quais possibilitam a localização e a quantificação de elementos químicos em regiões específicas da amostra. Aplicações neste campo para amostras biológicas são relativamente incipientes. Técnicas de preparo de material como por exemplo crio-técnicas, que preservam seu conteúdo iônico, de macromoléculas e estrutural tornam-se de uso essencial devem ser utilizadas. Estas, aplicadas ao estudo de bactérias diazotróficas e plantas poderiam possibilitar um estudo globalizado das interações morfológicas e estruturais, bem como do local de síntese e ação de biomacromoléculas e dinâmica de nutrientes.

Aliado a tudo isto, técnicas de processamento e análise de imagens ampliaram o campo de aplicações das observações ao microscópio em ecologia microbiana. Os benefícios destes métodos assistidos por computador variam do simples aumento de contraste até contagem automatizada de células e determinação de biomassa. Qualquer análise computadorizada de fotomicrografias requer uma imagem digitalizada, a qual pode ser obtida pela conversão da imagem fotográfica com câmera de vídeo. Comparação de diferentes conversores de imagens analógicas para digitais revelam que câmeras CCD foram superiores a sistemas baseados em vídeos na detecção de sinais fracos oriundos células bacterianas coradas com fluorocromos. Estas câmeras frias e de varredura lenta geram aumento de sensibilidade e estabilidade geométrica, aumentando a relação entre sinal e ruído.

Como podemos perceber, fica bastante claro que a despeito das valiosas contribuições da microscopia ao estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio, muito mais pode ser realizado tendo em vista os avanços tecnológicos neste campo.

## 9. REFERÊNCIAS

ALLEN, T.; RAJA, S.; DUNN, K. Cells expressing ENOD2 show differential spatial organization during the development of alfafa root nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.4, p.139-146, 1991.

- ARSÈNE, F.; KATUPITIVA, S.; KENNEDY, I.R.; ELMERICH, C. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.7, p. 48-57, 1994.
- ASHFORD, A.E.; ALLAWAY, W.G.; GUBLER, F.; LENNON, A.; SLEEGERS, J. Temperature control in Lowcryl K4M and glycol metacrylate during polymerization: is there a low-temperature embedding method? **Journal of Microscopy**, Oxford, v.44, p.107-126, 1986.
- AÏMUS, B.; SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and r-RNA targeted oligonucleotides. **Microbial Ecology**, New York, v.33, p.32-40, 1997.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédica: UFRRJ, 1996, 234p. Tese de Doutorado.
- BERRY, A.M.; McCULLY, M.E. Callose-containing deposits in relation to root-hair infections of *Alnus rubra* by *Frankia*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, p.798-802, 1990.
- BINGLE, W.H.; ENGELHARDT, H.; PAGE, W. J.; BAUMEISTER, W. Three-dimensional structure of the regular tetragonal surface layer of *Azotobacter vinelandii*. In: SLEYTR, U.B., et al., ed. **Crystalline bacterial cell surface layers**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p.96-100.
- BRITO, B.; PALACIOS, J.M.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGUESO, T.; YANG, W.C.; BISSELING, T.; SCHMITT, M.; KERL, V.; BAUER, T.; KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Temporal and spatial co-expression of hydrogenase and nitrogenase genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in pea. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.231-240, 1995.
- CHAN, E.C.S.; STRANIX, B.R.; DARLING, G.D.; NOBLE, P.B. A novel fluorochrome for the microscopy observation of microbial morphology in wet mounts, **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p.875-879, 1996.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.17, p.1-8, 1993.
- CRAIG, S.; MILLER, C.L.R. White resin and improved on-grid immunogold detection of vicilin, a pea seed storage protein. **Cell Biology International Report**, v.8, p.879-886, 1984.
- DANSCHER, G.; NØRGAARD, J. O. R. Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry and Histochemistry**, Baltimore, v.31, p.1394-1398, 1983.



- DANSCHER, G. Localization of gold in biological tissue: A photochemical method for light and electron microscopy. **Histochemistry**, v.71, p. 81-88, 1981.
- DART, P.J. Infection and development of leguminous nodules. In: HARDY, R.W.; SILVER, W.S., ed. **A Treatise on Dinitrogen Fixation**. New York: Wiley InterScience, 1977. Section 3. p.367-472.
- DAZZO, F.B.; ORGAMBIDE, G.G.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; HOLLINGSWORTH, R.I.; NINKE, K.O. ; SALZWEDEL, J.L. Modulation of development, growth dynamics, wall cristallinity and infection sites in white clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.3621-3627, 1996.
- DE BILLY, F.; BARKER, D.G.; GALLUSCI, P.; TRUCHET, G. Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfafa. **Plant Journal**, Oxford, v.1, p.27-31, 1991.
- DIEN, H.G.; GODBILLON, G.; SCHMIDT, E.L. Application of the fluorescent-antibody technique to the study of an isolate of *Beijerinckia* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, n.2, p.161-165, 1977.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA–SPI / Itaguaí: Rio de Janeiro; EMBRAPA –CNPAB. 1995. 60p.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.1139-1147, 1994.
- DUDLEY, M.E.; JACOBS, T.W.; LONG, S.R. Cell division induced in alfafa roots by *Rhizobium*. **Planta**, London, v.171, p.289-301, 1987.
- DUFRENE, Y.F.; VERMEIREN, H.; VANDERLEYDEN, J.; ROUXHET, P.G. Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, Washington, v.142, p.855-65, 1996.
- FARIA, S.M. de. **Occurrence, infection pathways and structure of root nodules from woody species of the Leguminosae**. Dundee: University of Dundee, 1988. Tese de doutorado.
- FARIA, S.M.; de SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I. A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp. (Leguminosae). **Plant Science**, Calcutta, v.45, p.143-147, 1986.
- FENDORF, S.E.; GUANGCHAO, L.; MORRA, M.J.; DANDURAND, L.M. Imaging a pseudomonad in mineral suspensions with scanning force and electron microscopy. **Soil Science Society of America Journal**, Washington, v. 61, p.109-115, 1997.
- FENDORF, S.E.; LI, G.; MORRA, M.J.; DANDURAND, L.M. Imaging a Pseudomonad in mineral suspension with scanning force and electron microscopy. **Soil Science Society of America Journal**, Washington, v.61, p.109-115, 1997.

- GLAUERT, A.M.; THORNLEY, M.J. Glutaraldehyde fixation of Gram-negative bacteria. **Journal of Research Microscopy Society of London**, London, v.85, p.449-453, 1966.
- GOI, S.R.; SPRENT, J.I.; JACOB-NETO, J. Effect of different sources of N on the structure of *Mimosa caesalpiniaefolia* root nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v.29, p.983-987, 1997.
- HAHN, D.; AMANN, R.I.; ZEYER, J. Whole-cell hybridization of *Frankia* strains with fluorescence or digoxigenin-labeled, 16S r-RNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1709-1716, 1993.
- HOLT, S.C.; BEVERIDGE, T.J. Electron microscopy: its development and application to microbiology. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, p.1-53, 1982.
- HUANG, C.X.; CANNY, M.J.; OATES, K.; McCULLY, M.E. Planing frozen hydrated plant specimens for SEM observation and EDX microanalysis. **Microscopy Research and Technique**, v.28, p.67-74, 1994.
- HUREK, J.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; MONTAGU, M.V.; KELLENBERGER, E. Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by *Azoarcus*. **Development in Plant Soil Science**, v.48, p.235-242, 1991.
- JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; MINCHIN, F.R.; BREWIN, N.J. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. **Plant Cell and Environmental**, Oxford, v.14, p.467-476, 1991.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.757-766, 1994.
- KELLENBERGER, E.; RYTER, A.; SÉCHAUD, J. Electron microscope study of DNA-containing plasm. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleodis in different physiological states. **Journal of Biophysics and Biochemistry Cytologic**, v.4, p. 671-678, 1958.
- KEPRE Jr., R.L; PRATT, J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. **Microbiology Reviews**, Washington, v.58, p.603-615, 1994.
- KIMURA, M.; MURAKAMI, H.; WADA, H. Microbial colonization and decomposition processes in rice rhizoplane. I. Microbial colonization associated with lateral root emergence. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.35, p.63-70, 1989.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.132, p.2899-2908, 1989.

- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labelling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, p.207-218, 1989.
- LEWIS, P.J.; ERRINGTON, J. Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, United Kingdom, v.142, p.733-740, 1996.
- MOENS, S.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J. Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a gram-negative nitrogen-fixing bacterium. **Microbiology**, Washington, v.141, p.2651-2657, 1995;
- 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***. Seropédica: UFRRJ, 1997. 328p. Tese de Doutorado.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, p.734-742, 1978.
- PEASE, D.C. Substitution techniques. In: KOEHLER, J.K., ed. **Advanced techniques in biological electron microscopy**. New York: Springer-Verlag, 1973. p.35-66.
- REINHOLD, B.; HUREK, T. Light microscopical visualization of diazotrophs on and in roots by immunogold-silver staining. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.6, p.298-301, 1988.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMANN, E.G.; FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.520-526, 1986.
- REIS JR., F.B.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Microscope evidence of the endophytic colonization in sugar cane by the nitrogen fixing bacteria *Acetobacter diazotrophicus*. 3<sup>rd</sup> Interamerican Conference on Electron Microscopy and XV Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy. **Acta Microscópica**, v.4, p.282, 1995.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as na electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.17, p.202-212, 1963.
- ROTH, J.; BENDAYAN, M.; CARLEMALM, E.; VILIGER, W.; GAVARITO, M. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. **Journal of Histochemistry and Citochemistry**, Baltimore, v.29, p.663-671, 1981.
- SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; WEISER, G.C.; ZUBERER, D.A.; BOUTON, J.H.; QUESENBERRY, K.H.; TYLER, M.E.; MILAN, J.R.; LITTEL, R.C. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v.11, p.287-295, 1979.

- SCHEIRER, D.C.; BRASELL, H.M. Epifluorescence microscopy for the study of nitrogen fixing blue-green algae associated with *Funaria hygrometrica* (Bryophyta) (Musci, morphology). **American Journal of Botany**, Baltimore, v.71, p.461-465, 1984.
- TEMPLE, S.J.; HEARD, J.; GANTER, G.; DUNN, K.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase from alfafa: nucleotide sequence, *In situ* localization, and transcript analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.218-227, 1995.
- TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. Cyanobacteria and black mangroves in northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.999-1011, 1995.
- TSUPRUN, V.L.; ZOGRAF, O.N.; ORLOVA, E.V.; KISELEV, N.A. Three-dimensional reconstruction of tubular crystals of *Azotobacter vinelandii* in MoFe protein. **Dokl. Biophys Akademia Nauk. SSSR**, New York, v.307/309, p.201-203, 1990.
- VAN LAERE, O.; DE WAEL, L.; DE MEY, J. Immuno gold staining (IGS) and immuno gold silver staining (IGSS) for the identification of the plant pathogenic bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, **Histochemistry**, v.83, p.397-399, 1985.
- VANDEN BOSCH, K.A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.143, p.187-197, 1986.
- WILLIAMS, R.C.; WYCKOFF, W.G. Application of metallic shadowcasting to microscopy. **Journal of Applied Physics**, Argone, v.17, p.23, 1946.
- WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology fields. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v.27, p.501-514, 1991.
- WILSON, K.J.; SESSITSCH, A.; CORBO, J.C.; GILLER, K.E.; AKKERMANS, A.D.L.; JEFFERSON, R.A.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. **Microbiology**, United Kingdom, v.141, p.1691-1705, 1995.
- WOLDRINGH, C.L. Effect of cations on the organization of the nucleoplasm in *Escherichia coli* prefixed with osmium tetroxide or glutaraldehyde. **Citobiologie**, v.8, p.97-111, 1973.