

Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas

Tharwat El-Sayed El-Desouk Radwan⁽¹⁾, Zeinat Kamel Mohamed⁽¹⁾ e Veronica Massena Reis⁽²⁾

⁽¹⁾Faculdade de Ciências, Dep. de Botânica, CEP 63514 El-Fayoum, Egito. E-mail: drsarwatey@hotmail.com ⁽²⁾Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 47, Caixa Postal 74.505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Resumo – Foi analisada a produção de compostos indólicos por *Azospirillum brasilense* Cd, *A. lipoferum* Br 17, *Herbaspirillum seropedicae* Z 67, *H. rubrisubalbicans* M4 e a estirpe 34 isolada de arroz, que não se enquadra em nenhuma das espécies de *Herbaspirillum* já descritas, em relação a diferentes condições de aeração e concentrações de sais. A maior aeração do meio propiciou aumento na produção de compostos indólicos pelas bactérias testadas. Foi verificado aumento desses compostos, em culturas estáticas, em meio sem nitrogênio no caso de *Azospirillum*, e na presença de N para as estirpes de *Herbaspirillum*. O aumento da concentração de sais no meio de cultivo inibiu a produção de compostos indólicos, embora tenha sido observado um pequeno aumento quando a concentração de CaCl_2 foi de 1 g L^{-1} . O efeito mais deletério da salinidade foi observado com a presença de NaHCO_3 , seguido de NaCl e Na_2SO_4 . *Azospirillum* produziu mais compostos indólicos em meio semi-sólido e *Herbaspirillum* em meio líquido, mas em menor nível.

Termos para indexação: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, auxina, ácido-3-indol acético, compostos indólicos.

Aeration and salt effects on indol acetic production by diazotrophic bacteria

Abstract – The production of indolic compounds by *Azospirillum brasilense* Cd, *A. lipoferum* Br 17, *Herbaspirillum seropedicae* Z 67, *H. rubrisubalbicans* M4, and strain 34 isolated from rice, which does not fit into the described *Herbaspirillum* species, was measured under aeration ratio and salt concentrations. Aeration of the medium increased growth and production of indole compounds by these bacteria. Under static condition, the production was higher both in nitrogen-free medium for *Azospirillum*, and in amended N medium for the *Herbaspirillum* strains. Increasing salt concentration into the medium inhibited the production of indole compounds, although a small increase in production was observed, when CaCl_2 concentration was raised above 1 g L^{-1} . Deleterious effect of salinity was more pronounced in the presence of NaHCO_3 , followed by NaCl and Na_2SO_4 . *Azospirillum* produced more indolic compounds in semi-solid cultures, and *Herbaspirillum* in liquid medium, but at lower levels.

Index terms: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, auxin, indole-3-acetic acid, indole compounds.

Introdução

Entre as bactérias diazotróficas que não formam nódulos quando associadas às plantas, o gênero *Azospirillum* é, sem dúvida, o mais estudado. Desse gênero fazem parte: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978), *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001) e *A. largimobile*, que é a única espécie desse gênero incapaz de fixar N_2 (Ben Dekhil et al., 1997). Já o gênero *Herbaspirillum* possui um número menor de espécies descritas: *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986), *H. rubrisubalbicans*

(Baldani et al., 1996), *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001) e *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003). Todos esses microrganismos são capazes de promover o crescimento de plantas, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas associados ao aumento da massa radicular, nutrição nitrogenada ou aumento da eficiência de absorção de nutrientes no solo, entre outros (Bashan et al., 2004).

As bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros acima citados produzem fitormônios, substâncias que reconhecidamente podem promover o crescimento de plantas. Fitormônios como auxinas, citoquininas e giberelinas foram detectados no sobrenadante do cultivo de bactérias do gênero *Azospirillum*, especialmente

A. brasilense (Crozier et al., 1988). A produção de ácido indol acético (AIA), GA₁ e GA₃, em cultivo de células de *H. seropedicae*, também foi detectada por Bastián et al. (1998).

Entre as auxinas, o ácido indol acético é o mais estudado e é o mais produzido pelas bactérias. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares (Barbieri et al., 1986). Evidências sobre a ação dessa substância, no desenvolvimento radicular, foram obtidas pela inoculação de um mutante de *Azospirillum* deficiente na produção desse fito-hormônio (Dobbelaere et al., 1999). Atualmente, pelo menos três vias metabólicas já foram descritas para a produção de AIA em *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, denominadas indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e a terceira via independente de presença de triptofano (Dobbelaere et al., 1999; Lambrecht et al., 2000). É importante verificar se a produção de compostos indólicos pode ser afetada por condições de alta pressão de O₂ e de estresse salino, que são as condições normalmente encontradas em solos arenosos com acúmulo de sais, como os de áreas de cultivo agrícola no Egito, e em regiões do Nordeste brasileiro.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da aeração e da adição de sais, na produção de AIA, por estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, sob condições controladas.

Material e Métodos

As seguintes estirpes foram usadas neste estudo: *Azospirillum brasilense* Cd, *A. lipoferum* Br 17, *Herbaspirillum seropedicae* Z 67, *H. rubrisubalbicans* M4 e *Herbaspirillum* spp. estirpe 34 isolada de arroz. Esses isolados foram depositados na coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Todos os experimentos foram conduzidos em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL do meio NFb semi-sólido e líquido modificado. Descrito por Döbereiner (1995), o meio NFb foi modificado pela omissão do indicador azul de bromotimol e das vitaminas, e pela adição de 1 g L⁻¹ de NH₄Cl, para não haver interferências desses compostos na formação da reação colorimétrica.

Uma colônia de cada estirpe estudada foi inoculada em 50 mL de meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986), por 48 horas, a 30°C. Esse meio de multiplicação tem a seguinte composição (g L⁻¹): glucose, 2; peptona, 1,5;

extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; ácido glutâmico, 1,5. O pH final foi ajustado para 6,8. Como inóculo dos testes foram usados 100 µL das células, lavadas 3 vezes em tampão 0,06 M de H₂PO₄ esterilizado (pH 6,8) por centrifugação, a 10.000 rpm, por 15 min a 4°C e, finalmente, ressuspensas em 30 mL do tampão. As culturas foram incubadas a 125 rpm, a 35°C, para *A. brasilense* e *A. lipoferum*, e a 30°C para as estirpes de *Herbaspirillum* spp., durante 48 horas. Nessas condições, não foi observada agregação das células, o que permitiu a quantificação do crescimento por densidade ótica (DO) a 492 nm, usando-se o espectrofotômetro Perkin Elmer II. Para as condições de fixação de nitrogênio foram utilizados vidros de 10 mL, com 5 mL de meio de cultivo NFb semi-sólido (1,75 g de ágar por litro) e triptofano. Na inoculação utilizou-se 100 µL de células lavadas, nas condições citadas acima, e os frascos foram incubados a 30°C, por 5 dias. Os sais foram adicionados por filtração, em filtro Millipore de 0,2 µm, após autoclavagem do meio de cultivo.

Os compostos indólicos foram estimados no sobrenadante das culturas, após o período de incubação. As células foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min, a 4°C, tendo-se usado todo o conteúdo dos frascos. Como vários compostos indólicos, além do AIA, podem ser medidos pelo método colorimétrico, o termo "compostos indólicos" foi usado no texto referindo-se às auxinas desse grupo (Crozier et al., 1988). O método colorimétrico usado foi descrito por Gordon & Weber (1951) e modificado por Minamisawa et al. (1992). O método consiste da mistura de 1 mL do filtrado de bactéria (sobrenadante), com 2 mL do reagente FeCl₃-HClO₃ (0,01 M FeCl₃ em 35% de HClO₃), e a presença do composto indólico foi indicada pela produção de coloração rosa. A intensidade de produção de compostos indólicos foi medida por colorimetria, com o filtro de 530 nm, após 25 min de incubação, utilizando-se o espectrofotômetro Perkin Elmer II. A concentração dos compostos indólicos foi estimada previamente, usando-se a curva padrão obtida pela adição de quantidades conhecidas de uma solução de AIA (Sigma): 25, 50, 100, 150, 200, 300 µM de AIA. A quantidade de compostos indólicos produzidos foi expressa pelo valor obtido na curva de AIA (µM), e o crescimento das culturas foi avaliado através de densidade ótica a 492 nm.

A avaliação da atividade da nitrogenase foi realizada apenas em vidros de 10 mL, com 5 mL de meio NFb semi-sólido, sem adição de nitrogênio. Após a inoculação

de 50 µL de células lavadas, conforme descrição anterior, os vidros foram tampados com algodão e incubados a 35°C. Após cinco dias, as rolhas de algodão foram trocadas por rolhas de borracha, e 10% da fase gasosa foi trocada por acetileno, com uma seringa de 1 mL. Após 1 hora de incubação a 30°C, a evolução do etileno produzido foi determinada, tendo-se injetado 0,5 mL da fase gasosa em cromatógrafo à gás (Perkin Elmer Auto System II) com uma coluna preenchida com Porapak N (2 m x 3,2 mm de diâmetro), a 110°C, e detector à chama de hidrogênio.

Para avaliar o efeito da aeração, o meio de cultivo NFb foi preparado conforme descrito acima, sem a adição de NH₄Cl, mas tendo-se acrescentado 100 µg mL⁻¹ de L-triptofano (Sigma) esterilizado por filtração, em filtro Millipore de 0,2 µm, e adicionado após a autoclavagem. Cada estirpe estudada passou por inoculação, tendo-se usado células lavadas, e cada série de inoculante (estirpe) foi dividida em 4 tratamentos: um foi mantido estático e os outros foram agitados a 50, 125 e 200 rpm, respectivamente. As culturas foram mantidas a 30°C por 48 horas. A concentração dos compostos indólicos foi medida no sobrenadante das culturas, obtido por centrifugação a 15.000 rpm, por 15 min a 4°C, usando-se o método colorimétrico.

Para a avaliação do efeito de doses de sais foi utilizado o meio de cultivo NFb semi-sólido e líquido, com quatro diferentes sais, que foram adicionados após a filtração (Millipore 0,2 µm), nas seguintes concentrações (g L⁻¹): NaHCO₃ e NaCl, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 e 50; CaCl₂,

0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 1, 5, 10 e 50 em meio líquido, e 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2 e 5 em meio semi-sólido; Na₂SO₄, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20 e 50. As células lavadas foram usadas como inóculo, e as condições de incubação foram as mesmas citadas anteriormente. Os frascos “controle” receberam o mesmo volume de água destilada estéril ao invés do inóculo. A concentração de compostos indólicos foi estimada em 48 horas para meio líquido e, após cinco dias, para cultivo em meio semi-sólido, com três repetições por tratamento.

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. Os experimentos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de DMS (diferença mínima significativa) a 1% de probabilidade. A análise estatística foi realizada pelo programa MSTATC.

Resultados e Discussão

As estirpes de *Herbaspirillum* produziram menos compostos indólicos em todas as condições avaliadas, quando comparadas com as estirpes de *Azospirillum*. A produção de compostos indólicos aumentou com a adição de N em todas as estirpes (Tabela 1). A aeração também influenciou a produção de compostos indólicos, tendo sido observado maior acúmulo nos tratamentos submetidos às maiores rotações: 125 e 200 rpm. A ausência de NH₄Cl provocou o aumento da multiplicação celular e da produção de compostos indólicos,

Tabela 1. Efeito da aeração na produção de compostos indólicos e na multiplicação celular, medida por densidade ótica avaliada a 492 nm, de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, crescidas em meio NFb líquido com e sem a adição de NH₄Cl (1 g L⁻¹), suplementado com 0,1 g L⁻¹ de triptofano, mantido estacionário e sob agitação a 50, 125 e 200 rpm, por 48 horas de incubação. Valores médios de 3 repetições.

Estirpes ⁽¹⁾	Estacionário		50 rpm		125 rpm		200 rpm		DMS 1%
	- N	+ N	- N	+ N	- N	+ N	- N	+ N	
Produção de compostos indólicos (M)									
Cd	26,56	128,08	16,39	269,06	39,44	335,12	164,04	297,40	5,75
Br 17	28,12	28,90	23,42	235,09	21,94	228,06	195,25	362,40	4,92
Z 67	10,70	21,05	12,25	66,35	14,52	75,31	44,21	85,46	4,84
M 4	10,88	39,12	10,94	66,43	16,63	77,75	31,24	101,21	4,79
34	16,86	87,05	22,96	115,10	20,44	123,26	35,93	97,23	6,46
Densidade ótica									
Cd	0,24	0,89	0,12	0,98	0,21	1,49	0,42	1,40	0,18
Br 17	0,21	0,87	0,17	0,64	0,16	1,37	0,40	1,47	0,20
Z 67	0,23	0,89	0,22	0,94	0,15	1,50	0,50	1,49	0,22
M 4	0,26	0,91	0,22	0,79	0,29	1,46	0,52	1,44	0,18
34	0,26	0,81	0,29	0,86	0,27	1,56	0,54	1,46	0,20

⁽¹⁾Cd: *Azospirillum brasilense*; BR 17: *A. lipoferum*; Z 67: *Herbaspirillum seropedicae*; M 4: *H. rubrisubalbicans*; 34: *Herbaspirillum* spp. isolado de arroz.

em presença de triptofano, em todas as estirpes, principalmente no tratamento de maior agitação (200 rpm), tendo indicado um aumento de 3 vezes na produção de AIA (Tabela 1).

Resultados similares foram obtidos por Piccoli et al. (1999), ao avaliar a produção de giberelina por *A. lipoferum* estirpe USA 5b. A influência positiva de amônio e oxigênio na produção de AIA era esperada, por esses compostos estarem envolvidos no processo de produção de AIA e no processo de fixação de N₂. O oxigênio é requerido durante a conversão de triptofano (Trp) em AIA, via indole-3-acetamida (IAM), e uma molécula de amônio é liberada durante a conversão de Trp a AIA. Por outro lado, sob condições microaeróbicas, as células preferencialmente catalisam a conversão enzimática do ácido indol pirúvico (IPyA) a AIA (Dobbelaere et al., 1999).

A adição de 1 e 5 g L⁻¹ de CaCl₂ aumentou a produção de compostos indólicos nas estirpes de *Herbaspirillum* testadas (Tabela 2). As estirpes de *Azospirillum*, Cd e Br 17, produziram 2 vezes mais compostos indólicos do que as estirpes de

Herbaspirillum. As concentrações mais elevadas, 10 e 50 g L⁻¹ desse sal, inibiram o crescimento. Estirpes de *Azospirillum* apresentaram dois picos de produção de AIA, um na concentração menor (0,01 g L⁻¹) e outro na concentração de 1 e 5 g L⁻¹. Esses dois picos (0,01 e 1 g L⁻¹) também foram observados nas condições de fixação de N₂. Estirpes de *Herbaspirillum* não mostraram esse comportamento, e a baixa concentração de compostos indólicos foi mantida, independentemente das doses de CaCl₂ usadas. A atividade de redução de acetileno de todas as estirpes foi inibida, parcialmente, pelas diferentes doses de CaCl₂ testadas, apesar de a maior concentração usada representar mais de 10 vezes o teor desse elemento, no meio de cultivo NFb. A multiplicação celular também foi inibida nas maiores concentrações de CaCl₂. Rao & Venkateswarlu (1985) observaram que a atividade da nitrogenase é mais sensível ao estresse salino que a multiplicação celular.

Na concentração de 0,05 g L⁻¹ de NaHCO₃ ocorreu maior produção de AIA, detectada nos meios de cultivo líquido e semi-sólido (Tabela 3). Em presença de doses maiores de NaHCO₃, foi observada diminuição da pro-

Tabela 2. Efeito da adição de CaCl₂, na produção de compostos indólicos (CI, em µM), na multiplicação celular medida por densidade ótica (DO a 492 nm), e na redução de acetileno (ARA, em nmoles de etileno h⁻¹ frasco⁻¹), de bactérias diazotróficas crescidas em meio líquido NFb, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de triptofano, mantido a 125 rpm, durante 48 horas. Valores médios de 3 repetições.

CaCl ₂ (g L ⁻¹)	Cd ⁽¹⁾		Br 17		Z 67		M 4		34	
	DO	CI	DO	CI	DO	CI	DO	CI	DO	CI
0,00	1,04	329,36	1,23	209,45	1,33	73,65	1,34	51,23	1,37	111,23
0,05	1,31	369,23	1,26	228,79	1,39	77,89	1,40	56,23	1,40	124,97
0,10	1,26	346,89	1,25	201,12	1,37	62,67	1,36	50,12	1,39	115,36
0,50	1,29	294,36	1,25	146,23	1,33	76,76	1,37	48,97	1,37	113,24
1,00	1,32	334,12	1,27	159,21	1,34	85,78	1,38	58,36	1,36	109,12
5,00	1,42	364,56	1,30	228,36	1,36	112,57	1,40	95,08	1,38	136,76
10,00	1,52	387,69	1,34	258,47	1,41	129,25	1,42	112,12	1,40	151,45
20,00	1,13	291,25	1,01	108,25	1,08	53,14	1,12	47,23	1,05	61,34
50,00	0,50	91,02	0,44	34,12	0,46	5,69	0,49	4,31	0,45	7,12
DMS 1%	0,38	11,77	0,36	10,24	0,37	8,42	0,38	8,18	0,38	9,59
	CI	ARA	CI	ARA	CI	ARA	CI	ARA	CI	ARA
0,00	530,12	187,30	502,13	163,12	35,12	125,02	36,04	140,98	34,98	136,12
0,01	598,23	194,58	572,19	172,25	48,26	135,84	46,85	148,45	44,12	141,43
0,02	519,15	192,58	445,21	154,23	46,91	112,35	45,68	139,21	43,89	122,14
0,05	451,02	178,92	308,97	145,36	41,94	110,09	45,02	123,14	41,08	103,12
0,10	371,31	174,12	296,45	140,12	27,12	108,95	36,98	103,21	34,25	95,14
0,50	333,25	169,09	271,25	136,98	21,54	113,68	30,12	89,65	24,25	84,65
1,00	588,68	176,58	427,34	146,97	16,12	101,25	27,09	106,21	23,07	96,32
2,00	348,28	149,45	261,38	158,97	10,21	95,87	19,02	94,56	30,12	87,98
5,00	308,12	137,89	254,36	139,12	9,89	82,87	11,12	83,58	16,18	80,27
DMS 1%	10,24	7,44	10,09	7,29	7,12	6,56	7,28	6,80	7,01	6,70

⁽¹⁾Cd: *Azospirillum brasilense*; BR 17: *A. lipoferum*; Z 67: *Herbaspirillum seropedicae*; M 4: *H. rubrisubalbicans*; 34: *Herbaspirillum* spp. isolado de arroz.

dução de auxina comparada ao controle. Os resultados obtidos indicaram, também, que em doses superiores a 0,05 g L⁻¹ deste sal, houve inibição da multiplicação celular e, conseqüentemente, da atividade de redução de acetileno. A produção de compostos indólicos foi maior no meio semi-sólido para *Azospirillum*, ao contrário do que ocorreu para as estirpes de *Herbaspirillum*, independentemente da concentração de NaHCO₃ utilizada. Bashan & Holguin (1997) descrevem que o mecanismo celular comum de adaptação ao estresse osmótico, em *Azospirillum*, é a acumulação de solutos orgânicos (osmólitos). Glicina betaina é acumulada por todas as estirpes, mas prolina e glutamato foram acumulados apenas em *A. brasilense* SHS6.

A produção de substâncias indólicas foi maior em todas as estirpes estudadas, em presença de 0,1 g L⁻¹ de Na₂SO₄ (Tabela 4). Doses superiores a 1 g L⁻¹ inibiram a produção, especialmente no cultivo semi-sólido. A multiplicação celular e a atividade de redução de acetileno foram inibidas pela adição de Na₂SO₄. Entretanto, as células foram menos sensíveis à pre-

sença do sal de Na₂SO₄ do que de NaHCO₃ (Tabelas 3 e 4).

A adição de NaCl ao meio de cultivo inibiu apenas a produção de auxina, nas estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z 67, em doses superiores a 5 g L⁻¹ (Tabela 5). Para *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M4, e para a estirpe 34 proveniente de plantas de arroz, essa inibição só ocorreu no meio de cultivo semi-sólido. Tripathi & Mishra (1998) observaram que concentrações elevadas de NaCl inibiram o crescimento, atividade de redução de acetileno e produção de AIA em *A. brasilense* Cd. A concentração normal de NaCl, usada no meio de cultivo NFb (0,1 g L⁻¹), mostrou os melhores resultados, em todos os parâmetros avaliados. Hartmann et al. (1991) observaram que a osmotolerância ao NaCl declinava na seguinte ordem: *Azospirillum halopraeferens*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. amazonense*. Os resultados de crescimento mostraram a mesma tendência para as estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* (Tabela 5).

Tabela 3. Efeito de concentrações de NaHCO₃, na produção de compostos indólicos (CI, em µM), na multiplicação celular medida por densidade ótica (DO a 492 nm) e na redução de acetileno (ARA, em nmoles de etileno h⁻¹ frasco⁻¹), de bactérias diazotróficas crescidas em meio líquido NFb e semi-sólido, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de triptofano, mantido a 125 rpm, durante 48 horas. Valores médios de 3 repetições.

NaHCO ₃ (g L ⁻¹)	Cd ⁽¹⁾		Br 17		Z 67		M 4		34	
	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido
0,00	329,36	530,12	209,45	502,13	73,65	35,12	51,23	36,04	111,23	34,98
0,05	338,45	594,38	213,89	547,36	76,01	44,58	53,27	47,21	125,48	46,31
0,10	321,48	510,08	157,59	506,48	56,09	35,89	46,78	40,18	116,89	41,28
0,50	250,79	309,87	130,12	249,35	47,06	27,98	42,18	30,25	96,27	36,27
1,00	104,77	263,14	76,31	197,64	25,16	24,35	21,57	25,47	59,01	30,14
5,00	10,12	97,36	8,12	137,28	5,87	20,15	5,01	19,78	7,95	18,46
10,00	8,45	44,15	6,97	53,21	3,28	11,83	2,97	10,27	8,97	12,54
20,00	4,58	22,18	3,57	24,37	2,12	7,89	1,87	8,01	3,31	7,86
50,00	0,00	5,02	0,00	4,91	0,00	4,61	0,00	5,05	0,00	4,31
DMS 1%	6,92	9,80	6,44	9,63	5,23	5,90	5,11	6,23	5,43	4,81
	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA
0,00	1,26	187,30	1,24	163,12	1,32	125,02	1,28	140,98	1,36	136,12
0,05	1,28	192,35	1,25	168,94	1,32	129,12	1,31	147,23	1,38	139,87
0,10	1,23	186,24	1,16	163,95	1,16	96,31	1,19	138,78	1,19	118,97
0,50	1,19	142,38	1,02	138,14	0,96	46,89	1,13	70,48	1,13	55,12
1,00	1,01	55,34	0,82	53,48	0,79	19,48	0,97	16,31	0,98	16,31
5,00	0,95	12,31	0,75	11,24	0,10	8,64	0,12	3,14	0,12	2,94
10,00	0,15	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00
20,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
50,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
DMS 1%	0,31	5,28	0,30	5,43	0,32	4,78	0,33	5,05	0,34	5,21

⁽¹⁾Cd: *Azospirillum brasilense*; BR 17: *A. lipoferum*; Z 67: *Herbaspirillum seropedicae*; M4: *H. rubrisubalbicans*; 34: *Herbaspirillum* spp. isolado de arroz.

Tabela 4. Efeito da adição de concentrações de Na₂SO₄, na produção de compostos indólicos (CI, em µM), na multiplicação celular medida por densidade ótica (DO a 492 nm) e na redução de acetileno (ARA, em nmoles de etileno h⁻¹ frasco⁻¹), de bactérias diazotróficas crescidas em meio líquido NFb semi-sólido, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de triptofano, mantido a 125 rpm, durante 48 horas. Valores médios de 3 repetições.

Na ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	Cd ⁽¹⁾		Br 17		Z 67		M 4		34	
	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido
0,0	329,36	530,12	209,45	502,13	73,65	35,12	51,23	36,04	111,23	34,98
0,1	358,35	589,25	249,45	552,39	81,84	40,47	56,23	43,28	124,97	39,18
0,2	332,15	453,21	216,47	406,67	71,09	33,25	50,12	39,45	115,36	34,17
0,5	289,18	340,47	135,87	286,34	65,27	26,37	48,97	28,09	113,24	26,87
1,0	240,24	376,95	121,23	313,75	73,58	28,62	48,67	37,73	109,12	43,77
5,0	249,78	191,81	143,57	145,16	55,14	19,48	64,87	18,24	123,19	16,57
10,0	141,58	50,17	71,48	47,29	42,39	10,24	55,18	9,08	105,08	7,94
20,0	99,48	25,48	58,54	24,12	37,59	8,45	43,59	7,89	83,43	6,95
50,0	31,27	6,57	23,27	5,49	20,18	4,15	25,00	4,05	48,00	3,91
DMS 1%	10,31	11,44	9,68	11,08	6,60	6,40	6,95	6,58	7,29	6,30
	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA
0,00	1,33	187,34	1,30	163,12	1,31	125,02	1,33	140,98	1,37	136,12
0,05	1,35	190,45	1,32	166,27	1,34	130,48	1,34	144,37	1,41	140,24
0,10	1,31	176,34	1,20	148,79	1,29	123,18	1,30	134,58	1,35	120,19
0,50	1,27	160,14	1,02	135,48	1,25	99,82	1,15	129,78	1,27	111,24
1,00	1,29	156,12	1,05	132,14	1,26	105,89	1,19	124,27	1,18	98,76
5,00	1,13	164,25	0,79	143,67	1,17	100,49	0,98	128,94	1,00	112,34
10,00	0,71	105,87	0,62	91,37	0,92	60,24	0,74	79,58	0,81	67,21
20,00	0,50	58,26	0,53	45,87	0,76	34,58	0,63	41,59	0,65	40,08
50,00	0,37	39,43	0,35	35,76	0,37	24,01	0,55	27,89	0,53	25,97
DMS 1%	0,37	5,43	0,37	5,11	0,38	4,89	0,35	5,03	0,37	5,16

⁽¹⁾Cd: *Azospirillum brasilense*; BR 17: *A. lipoferum*; Z 67: *Herbaspirillum seropedicae*; M 4: *H. rubrisubalbicans*; 34: *Herbaspirillum* spp. isolado de arroz.

Tabela 5. Efeito da adição de concentrações de NaCl, na produção de compostos indólicos (CI, em µM), na multiplicação celular medida por densidade ótica (DO a 492 nm) e na redução de acetileno (ARA, em nmoles de etileno h⁻¹ frasco⁻¹), de bactérias diazotróficas crescidas em meio líquido NFb semi-sólido, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de triptofano, mantido a 125 rpm, durante 48 horas. Valores médios de 3 repetições.

NaCl (g L ⁻¹)	Cd ⁽¹⁾		Br 17		Z 67		M 4		34	
	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido
0,0	329,36	530,12	209,45	502,13	73,65	35,12	51,23	36,04	111,23	34,98
0,1	356,31	603,12	228,79	572,19	77,89	42,12	56,23	44,02	124,97	43,12
0,2	338,19	494,09	201,12	445,21	62,67	34,21	50,12	36,45	115,36	35,23
0,5	287,28	329,12	126,28	308,97	76,76	29,45	48,97	30,12	103,24	28,49
1,0	300,00	371,31	159,21	326,54	85,78	31,28	58,36	32,58	99,24	33,03
5,0	159,60	159,41	106,53	142,31	56,53	21,03	64,87	22,58	89,56	21,32
10,0	46,68	102,31	83,79	94,85	23,59	15,19	81,23	17,16	74,41	15,47
20,0	16,65	61,15	14,96	47,45	5,36	8,45	97,56	9,54	83,37	8,12
50,0	3,59	0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DMS 1%	8,13	10,42	7,12	10,09	6,14	6,16	5,87	6,36	6,56	6,26
	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA	DO	ARA
0,0	1,04	187,30	0,96	163,12	1,22	125,02	1,24	140,98	1,21	136,12
0,1	1,24	191,20	1,16	165,87	1,33	128,14	1,35	142,13	1,30	139,47
0,2	1,28	179,30	1,20	146,38	1,26	108,39	1,08	127,13	1,26	123,58
0,5	1,29	162,30	1,07	129,23	1,03	91,25	0,83	96,34	0,87	92,48
1,0	0,96	187,70	0,71	151,27	0,85	98,52	0,70	97,41	0,69	94,28
5,0	0,80	156,30	0,44	119,58	0,41	63,12	0,56	59,64	0,53	62,15
10,0	0,42	90,12	0,53	67,54	0,28	40,28	0,57	37,45	0,61	35,48
20,0	0,55	6,36	0,22	3,48	0,32	2,34	0,70	3,59	0,40	4,25
50,0	0,05	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
DMS 1%	0,32	5,06	0,31	4,94	0,34	4,48	0,34	4,72	0,32	4,65

⁽¹⁾Cd: *Azospirillum brasilense*; BR 17: *A. lipoferum*; Z 67: *Herbaspirillum seropedicae*; M 4: *H. rubrisubalbicans*; 34: *Herbaspirillum* spp. isolado de arroz.

Conclusões

1. O aumento da aeração, mediante a agitação do meio de cultivo, propicia maior produção de compostos indólicos, por bactérias diazotróficas, pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

2. O aumento da concentração de sais no meio de cultivo inibe a produção de compostos indólicos, crescimento e atividade da nitrogenase, por bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

3. O efeito deletério da salinidade é mais acentuado em presença de NaHCO₃, seguido por NaCl e Na₂SO₄.

4. Estirpes de *Azospirillum* produzem mais compostos indólicos do que estirpes de *Herbaspirillum*.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciência do Cairo, Egito, pela bolsa de doutorado do primeiro autor; à Finep, pelo apoio ao projeto Pronex II número 76971051.00.

Referências

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a light plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.
- BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.
- BEN DEKHIL, S.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov. and elevation of the *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.20, p.72-77, 1997.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164, 1999.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: ALEF, K.; NANNIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic, 1995. p.134-141.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFLES, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.
- GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.
- HARTMANN, A.; PRABHU, S.R.; GALINSKI, E.A. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. **Plant and Soil**, v.137, p.105-109, 1991.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, J. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacteria associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v.140, p.679-693, 1989.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFLES, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C₄-fibre plants. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168, 2001.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.55, p.417-430, 1983.
- MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2832-2839, 1992.
- PICCOLI, P.; MASCIARELLI, O.; BOTTINI, R. Gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultured in chemically-defined medium as affected by oxygen availability and water status. **Symbiosis**, v.27, p.135-145, 1999.

- RAO, A.V.; VENKATESWARLU, B. Salt tolerance of *Azospirillum brasilense*. **Acta Microbiologica**, v.135, p.55-59, 1985.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with root of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.43-51, 1987.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.967-980, 1978.
- TRIPATHI, A.K.; MISHRA, B.M. Responses of *Azospirillum brasilense* to salinity stress. In: MALIK, K.A.; MIRZA, M.S.; LADHA, J.K. (Ed.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.179-185. (Developments in plant and soil sciences, 79).
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1979-1983, 2003.

Recebido em 11 de maio de 2004 e aprovado em 29 de março de 2005