

EWERTON CALTRAN MANARIN

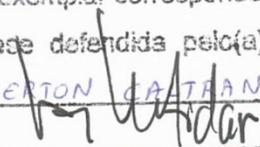
**“POTENCIAL DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR
LEGUMINOSAS NODULADAS E CIANOBACTÉRIAS
TERRESTRES NA MATA ATLÂNTICA, SP”**

**CAMPINAS
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EWERTON CALTRAN MANARIN

“POTENCIAL DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR
LEGUMINOSAS NODULADAS E CIANOBACTÉRIAS
TERRESTRES NA MATA ATLÂNTICA, SP”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
EWERTON CALTRAN MANARIN

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M311p	<p>Manarin, Ewerton Caltran, 1984- Potencial de fixação de nitrogênio por leguminosas noduladas e cianobactérias terrestres na Mata Atlântica, SP / Ewerton Caltran Manarin. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Marcos Pereira Marinho Aidar. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Nitrogênio. 2. Leguminosa. 3. Cianobactéria. 4. Floresta ombrófila densa atlântica. I. Aidar, Marcos Pereira Marinho. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Potential for nitrogen fixation by nodulated legumes and terrestrial cyanobacteria in Atlantic Forest, SP

Palavras-chave em Inglês:

Nitrogen

Legumes

Cyanobacteria

Atlantic dense ombrophylous rainforest

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Marcos Pereira Marinho Aidar [Orientador]

Sara Adrián López de Andrade

Célia Leite Sant'anna

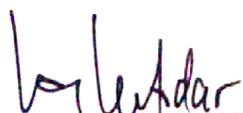
Data da defesa: 03-12-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 03 de Dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

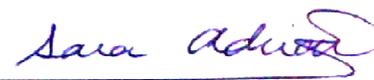
Dr. Marcos Pereira Marinho Aida (Orientador)


Assinatura

Dra. Célia Leite Sant'Anna


Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade


Assinatura

Profª. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Assinatura

Dra. Catarina Carvalho Nievola

Assinatura

Você acha que tem tudo planejado
e então descobre que nada na vida será do jeito que você acha que será.
Nada nunca é.
E quanto mais aprendemos, menos sabemos.
Mas nos mantêm humildes, crescendo e mudando, o que, no final, é o propósito.
Erica and Dr. Tom

No regrets, just love.
Katy Perry

para meus pais (Edson e Cida)
pelo apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

- ao meu orientador Marcos Aidar, pela orientação, confiança, suporte, credibilidade, apoio, enorme paciência e por estar me acompanhando e aguentando por todos estes anos.
- aos meus colegas de orientação, por quem desenvolvi grande admiração: Bruno Rosado, Nídia Mara Marchiori, Gian Piero Bini Cano, Giseli Areias, Sabrina Latansio.
- aos meus companheiros de campo pela ajuda irrestrita, alegria e otimismo, Pesão (Renato Belinelo), Vagner Toledo, Leila Vergal, Giseli, Nídia, Luciana, Sandra Patrícia, Giam, Bruno, Janaína.
- à Alice Cassetari e ao Watson Arantes Gamma Jr. pela grande amizade, parceria e ajuda imensurável no campo e no laboratório com microbiologia e ficologia.
- ao Adriano Afonso Spielmann pelas preciosas informações iniciais sobre as cianobactérias no PESM.
- aos meus amigos e colegas do laboratório que tanto estimo: Larissa, Maíra, Dani, Gabi, Júnior, Bruno, Pedro, Janaína, Fernanda e todos os outros.
- aos técnicos Luciano, Néia, Dulce, Denise, Diego e Carlão, por estarem sempre disponíveis a me ajudar quando precisei.
- à minha estimada amiga Lívia Cordi pela ajuda, apoio e compreensão nos momentos finais de redação da dissertação. Aos meus amigos do herbário, Mônica, Washington, Edilaine, Pâmela, Ariadne, Renata e todos os demais que estiveram comigo neste período.
- a todos meus amigos que acabei dando pouca atenção, mas que carrego no coração, Marna, Janaína, Márcia, Graciela, Fabíola, Vanessa, Rosana, Érica, Júnior e outros.
- ao CNPq, pela bolsa concedida.
- ao Programa de Pós Graduação da Biologia Vegetal e ao Instituto de Biologia da Unicamp.
- à Prof^a Marlene Schiavinatto, pela amizade, ajuda e empréstimo dos equipamentos do laboratório de fisiologia e pelo espaço cedido na casa de vegetação.
- ao Prof^o Ladslav Sodek, pela ajuda e empréstimo dos equipamentos.
- à Prof^a Célia Sant'anna pela colaboração e por ceder o laboratório de ficologia do Instituto de Botânica.
- ao Dr. Plínio Camargo e Albertino Bendassoli, pela colaboração com as análises isotópicas.
- ao Dr. Eduardo Armas, pelo auxílio com o ArcGis.
- à Janaína Rocha, pela ajuda com as análises estatísticas não-paramétricas
- à Prof^a Cláudia Haddad, pela cordialidade e gentileza, sempre.
- ao Prof^o Paulo Mazzafera, pela enorme ajuda nas pré-bancas.
- ao Dr. Leonardo Meireles, Dr. Gilberto Justino, Dr. Plínio Camargo, Dr. João Semir, pelas correções e sugestões feitas à dissertação.
- às professoras integrantes da Banca de defesa: Dra. Célia Sant'anna, Dra. Sara Adrián, Dra. Cláudia Haddad, Dra. Catarina Nievola.
- à Maria Roseli, secretária do Programa de Pós Graduação, por me ajudar sempre.
- ao meu grande amigo Vagner de Carvalho, pela amizade, estímulo, companheirismo e paciência.
- aos meus grandes amigos que fiz em Campinas: Vagner, Junior, Natascha, Cátia, Graciela, Diogo e todos os demais, pelo apoio e companheirismo.
- aos meus pais, pela ajuda e apoio em absolutamente todas as situações.
- a toda minha família e amigos, que mesmo distante, sempre me apoiaram.
- ao Projeto Biota – Gradiente Funcional (Temático n° 03/12595-7) e ao Prof^o Carlos Alfredo Joly, pelo apoio logístico e financeiro concedido para a elaboração desta pesquisa.
- aos funcionários do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Picinguaba e Santa Virgínia por colaborarem para a realização deste trabalho
- a todos os demais colegas que participaram direta ou indiretamente deste processo.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

Resumo

Este trabalho avaliou a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por leguminosas e cianobactérias de vida livre na Floresta Ombrófila Densa Atlântica. Nódulos radiculares de leguminosas presentes em parcelas de 1 hectare foram amostrados para as fisionomias de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (FTB) e na Floresta Ombrófila Densa Montana (FM), localizadas em diferentes altitudes. A atividade da enzima nitrogenase dos nódulos foi avaliada através da atividade de redução de acetileno. FTB apresentaram a maior quantidade de nódulos e maior atividade da enzima nitrogenase em relação à FM. A taxa anual de FBN pelas leguminosas foi estimada em 2,06 kg N ha⁻¹ e 0,230 kg N ha⁻¹ para FTB e FM, respectivamente. A FBN apresentou os maiores valores no outono e os menores no inverno para a FTB. E maiores valores no outono e primavera para a FM. Seis estirpes de rizóbios isolados da floresta estudada tiveram sua capacidade de nodulação testada em experimento de casa de vegetação com a leguminosa *Inga sessilis*, que apresentou capacidade de se associar formando nódulos com cinco isolados da floresta, e com mais quatro isolados usados como controle, se mostrando uma leguminosa com baixa especificidade com seu simbiote. Cianobactérias de vida livre tiveram a FBN medidas em trechos intactos e trechos antropizados na FM. Estes organismos foram encontrados na superfície de solos e rochas em áreas expostas ao sol e sob a forma de colônias de *Nostoc* sp e de crostas, associadas com outros organismos. As medidas de FBN foram feitas através do ensaio de redução de acetileno em consórcio com técnicas isotópicas. As formas coloniais apresentaram maior atividade de FBN que as formas crostosas, e em ambas, a atividade foi maior no inverno que no verão. A FBN foi maior para trechos antropizados, 127 e 48 g N m⁻² ano⁻¹ para coloniais e crostosas, respectivamente e de 46 e 30 g N m⁻² ano⁻¹ para coloniais e crostosas de locais intactos, respectivamente. As FBN por leguminosas e cianobactérias para as áreas intactas de floresta se mostraram baixas, mas estão de acordo com o esperado para florestas maduras. Estes organismos provavelmente aumentam suas taxas de FBN quando a floresta sofre distúrbio, assim como foi detectado para as cianobactérias em trechos antropizados.

Palavras-chave: Nitrogênio; leguminosas; cianobactérias; floresta ombrófila densa atlântica.

Abstract

This study evaluated rates of biological nitrogen fixation (BNF) by legumes and free-living cyanobacteria in Atlantic Rainforest. Legume root nodules found in 1 hectare plots were sampled for the Lowland physiognomy (LP) and Mountain physiognomy (MP), located at different altitudes. The nitrogenase enzyme activity of nodules was assessed by acetylene reduction assay. LP had the highest number of nodules and greater activity of the nitrogenase regarding MP. The annual rate of BNF by legumes was estimated at 2.06 kg N ha⁻¹ and 0.230 kg N ha⁻¹ for LP and MP, respectively. The BNF had the highest values in autumn and lowest in winter for LP. And higher values in autumn and spring for MP. Six strains of rhizobia isolated from the studied forest had their nodulation capacity tested in a greenhouse experiment with the legume *Inga sessilis*, which showed ability to form nodules with five strains, and with over four isolates used as controls, showing that this legume specie has a low specificity with its symbiote. Free-living cyanobacteria had BNF measured in intact and anthropized sites of the MP. These organisms were found in surface soils and rocks in areas exposed to the sun and in the form of colonies of *Nostoc* sp and crusts associated with other organisms. The measurements were made using acetylene reduction assay in consortium with isotopic techniques. Colonial forms showed higher activity than crust forms, and for both, the activity was higher in winter in comparison to summer. The BNF was higher for anthropized sites of the forest, 127 and 48 g N m⁻² year⁻¹ for colonial and crusted, respectively, and for intact sites, 46 and 30 g N m⁻² year⁻¹ for colonial and crusted, respectively. BNF by legumes and cyanobacteria in intact forest were low, but are consistent with expected for mature forests. These organisms probably increase their rates of BNF in disturbed conditions of the forest as well as detected for cyanobacteria in anthropized sites.

Key words: Nitrogen; legume; cyanobacteria; Atlantic Dense Ombrophylous Rainforest.

Índice

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução geral	10
1.1 Floresta Atlântica.....	10
1.2 Nitrogênio.....	11
1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	14
2. Objetivo geral.....	16
3. Capítulo I – Variação altitudinal e sazonal na ocorrência e atividade de fixação de nitrogênio de nódulos radiculares de leguminosas	
3.1 Introdução.....	18
3.2 Material e métodos.....	21
3.3.1 Área de estudo.....	21
3.2.2 Delineamento amostral para determinação da ocorrência de nódulos.....	24
3.2.3 Avaliação da atividade da enzima nitrogenase dos nódulos radiculares.....	26
3.2.4 Análise dos dados.....	27
3.2.5 Determinação da capacidade nodulífera de isolados de rizóbio em casa de vegetação.....	29
3.3 Resultados.....	31
3.3.1 Ocorrência de nódulos e atividade da enzima nitrogenase.....	31
3.3.2 Análise da capacidade de nodulação em casa de vegetação.....	36
3.4 Discussão.....	38
3.5 Conclusões.....	44
4. Capítulo II – Potencial de fixação de N ₂ por cianobactérias de vida livre em Floresta Ombrófila Densa Montana	
4.1 Introdução.....	45
4.2 Material e método.....	50
4.2.1 Coleta de cianobactérias no campo.....	50
4.2.2 Atividade da enzima nitrogenase.....	52
4.2.3 Estimativa da fixação de nitrogênio por técnicas de isotopia.....	52
4.2.3.1 Cultivo.....	53
4.2.3.2 Técnicas de isotopia.....	54
4.3 Resultados.....	55
4.3.1 Ocorrência.....	55
4.3.2 Atividade da enzima nitrogenase.....	57
4.3.3 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio por técnicas de isotopia.....	60
4.3.4 Potencial de fixação biológica de nitrogênio pelas formas de vida nos locais de ocorrência.....	60
4.4 Discussão.....	61
4.5 Conclusão.....	65
5. Considerações finais.....	66
6. Referências.....	67
7. Anexos.....	77

1. Introdução Geral

1.1 Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica abrange, atualmente, entre 12 e 15% do território brasileiro, estendendo-se por quase toda a faixa litorânea do país, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Ribeiro et al., 2009). No Estado de São Paulo restaram apenas 12,3% de sua área original, composta por fragmentos de diversos tamanhos, formas e estádios de sucessão e situação de conservação (SOS Mata Atlântica, 2006). As áreas remanescentes estão representadas principalmente por áreas desfavoráveis para o desenvolvimento de atividades agrícolas (Leitão-Filho, 1987).

Apesar da intensa destruição, a Floresta Atlântica ainda é uma das florestas mais ricas em biodiversidade do planeta. É detentora de vários recordes de riqueza de espécies e apresenta endemismos em vários grupos de plantas e animais, sendo considerada um “hotspot” para a conservação da biodiversidade (Myers et al., 2000).

Uma das maiores áreas de remanescentes contínuos de Floresta Atlântica está representada pelo Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), que foi criado em 1977. Com uma área de 315.390 ha, é caracterizado por uma região montanhosa que abrange 23 municípios do litoral e do Vale do Paraíba no Estado de São Paulo. A grande riqueza e diversidade de espécies tornam esta área florestal de fundamental importância para conservação (Instituto Florestal - IFLORESTAL, 2006).

A Floresta Atlântica é uma região heterogênea que inclui uma grande variedade de fisionomias e composições florestais e está distribuída em diferentes condições climáticas e topográficas (Metzger, 2009; Vieira et al., 2008). A composição florística e a estrutura da comunidade arbórea de partes do PESM coincidem com os limites altitudinais da Floresta Ombrófila Densa proposta pelo sistema de classificação de Veloso et al. (1991) em: 1) Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas – 5 a 50 m de altitude, sobre o solo de restinga; 2) Floresta

Ombrófila Densa Submontana – no sopé da Serra do Mar, com altitude variando entre 50 e 500 m; 3) Floresta Ombrófila Densa Montana – 500 a 1200 m (Sanchez, 2001). Vários trabalhos buscaram obter padrões ou detectar variações na composição florística, estrutura e funcionamento destas diferentes altitudes (Martins, 2010; Vieira et al., 2011., Sousa Neto et al., 2011; Alves et al., 2010; Padgurschii et al., 2011; Dias, 2010).

Os solos da Floresta Atlântica são muito lixiviados, ácidos e distróficos, típicos de florestas tropicais. Apesar da baixa fertilidade, estes solos não apresentam sintomas de deficiência nutricional, uma vez que o ciclo de nutrientes é praticamente fechado, devido à decomposição do material orgânico ao longo do ano, associado a uma pequena perda por lixiviação e absorção de elementos do solo pela vegetação (Silva et al., 2007). As regiões de maior altitude desta floresta detêm maior biomassa sobre os solos, maior riqueza nutricional dos solos e os maiores estoques de carbono e nitrogênio em relação às menores altitudes, sugerindo, para cada faixa altitudinal, um funcionamento diferenciado quanto ao ciclo de nitrogênio e do ecossistema como um todo (Alves et al., 2010; Martins, 2010; Vieira et al., 2011).

1.2 Nitrogênio

O Nitrogênio (N) é um importante macro-nutriente e é essencial para todos os organismos, pois é um componente básico das proteínas, estando presente em aminoácidos, enzimas e ácidos nucléicos. Compõe as clorofilas e é o elemento adquirido pelas plantas em maior quantidade do solo. O N das plantas é a base para a dieta de proteínas de todos os animais, incluindo os humanos. Depois do carbono e do oxigênio, o nitrogênio é o elemento mais abundante na matéria seca de plantas, com cerca de 10 a 30 g kg⁻¹ (McNeill & Unkovich, 2007).

Do total de N existente, cerca de 98% está presente em rochas, solo e sedimentos. Os outros 2% estão em um ciclo dinâmico envolvendo a atmosfera, oceanos, lagos, rios, plantas, bactérias e animais. Na atmosfera, o N existe principalmente na forma molecular (N_2), que corresponde a 78% da composição dos gases atmosféricos. Outras formas de N circulam na atmosfera na forma de traços de óxido de nitrogênio, gás amônia, compostos amonificados, vapor de ácido nítrico, nitrato particulado e nitrogênio orgânico (Nieder & Benbi, 2008).

O ciclo terrestre de nitrogênio compreende reservatórios no solo, planta e animais. Esses reservatórios contêm uma quantidade relativamente pequena de N biologicamente ativo em comparação com as grandes reservas de N relativamente inertes da litosfera e atmosfera, mas exercem uma substancial influencia na dinâmica do ciclo biogeoquímico global do N (McNeill & Unkovich, 2007). Compostos atmosféricos de nitrogênio circulam por terra e água através de deposição pela chuva ou deposição seca. A ciclagem ocorre via decomposição de matéria orgânica no solo, a qual provê N disponível para plantas e para microrganismos e após sua morte, o N retorna para os reservatórios de N orgânico no solo (McNeill & Unkovich, 2007). Os principais processos que atuam como porta de entrada de N em ecossistemas terrestres são a fixação do N_2 atmosférico em NH_3 por meio biológico e também industrial e a deposição seca e úmida (McNeill & Unkovich, 2007).

As florestas tropicais frequentemente apresentam substratos pobres em nutrientes minerais. Entretanto, o nitrogênio é geralmente considerado um nutriente disponível em grande quantidade em sistemas não perturbados. Assim, uma eficiente ciclagem de N é pensada como a responsável pelo alto status de N (Vitousek & Sanford, 1986). Um contínuo suprimento de N por processo biológico de fixação de N_2 é outro fator supostamente envolvido em manter grandes reservas de N em florestas intactas, e na regeneração das florestas após distúrbio (Pons et al., 2006).

Estima-se que a taxa de fixação de nitrogênio por processos naturais nos ecossistemas terrestres seja de $128 \text{ tg N ano}^{-1}$, responsável por suprir 15% das necessidades de nitrogênio de todos os tipos de biomas (Galloway et al., 2004). Além dos processos naturais, as atividades

humanas, pós-revolução industrial têm contribuído com uma fixação adicional de $120 \text{ tg N ano}^{-1}$, representada pela queima de combustíveis fósseis para produção de energia, produção de fertilizantes e cultivo agrícola de leguminosas (Rockström et al., 2009) (fig. 1). O N produzido pelas atividades humanas entra no local de aplicação, mas por causa de sua mobilidade, grande parte é perdida e entra no ciclo biogeoquímico do N tendo influências regionais e globais, contribuindo com o aumento dos gases de efeito estufa, poluição aquática da zona costeira, de águas continentais em geral e deposição nos solos (Vitousek et al., 1997). Uma margem segura de fixação antrópica de N sugerida seria de apenas 30% do valor total que é fixado atualmente no planeta (Rockström et al., 2009).

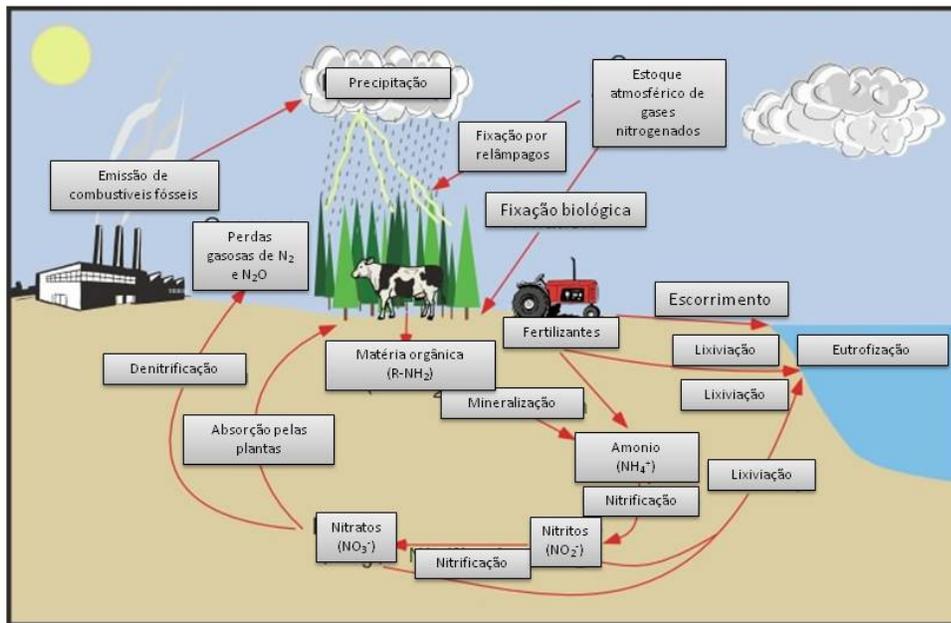


Figura 1. Componentes naturais e antropizados do ciclo do nitrogênio. Modificado de <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9s.html>.

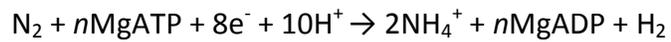
1.3 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é responsável pela maior parte da fixação do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_4^+). Esse processo representa a porta de entrada do nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio e é realizada por organismos procaríotos.

Os fixadores de N_2 são chamados de organismos diazotróficos e apresentam hábitos característicos. Podem ser espécies heterótrofas, que necessitam de um suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente da energia da luz (fotossíntese) e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto. Podem ser espécies de vida livre e que competem com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente, ou podem ser espécies autótrofas fotossintetizantes.

São conhecidas espécies representantes de vários grupos que são capazes de fixar nitrogênio, tais como: bactérias fotossintéticas (*Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (*Clostridium* spp.), bactérias aeróbicas (*Azotobacter* spp.) e também cianobactérias (algas verdes-azuladas) e actinomicetos (*Frankia*) (Sprent & Sprent, 1990). As leguminosas que estabelecem simbiose com rizóbios formando nódulos radiculares são efetivas em fixar N_2 nos ecossistemas terrestres. Além destes, cianobactérias da filosfera, líquens, bactérias da rizosfera e bactérias endofíticas também têm importante papel na FBN (Vitousek et al., 2002).

É o complexo da enzima nitrogenase que executa redução do nitrogênio na sua forma molecular (N_2) em amônio (NH_4^+) assim como mostrado na equação 1. Esta reação é considerada uma das mais difíceis a ser catalisada por um sistema biológico (Ludden, 2001). Este complexo enzimático é amplamente distribuído entre os Reinos Bacteria e Archaea (Young, 1992), mas nenhum organismo eucarioto capaz de fixar N_2 por si só foi descoberto (Giller, 2001; Ludden, 2001).



($n \geq 2$ por elétron)

[1]

A enzima, ou complexo enzimático, é composta por duas unidades, a Fe-proteína e a MoFe-proteína. As duas unidades interagem cooperativamente durante o processo de FBN. Essas unidades componentes da enzima são irreversivelmente inativadas pelo oxigênio, o que torna a nitrogenase altamente sensível a este elemento (Shaw & Brill, 1977). A inibição da atividade da nitrogenase *in vivo* pelo O_2 vai desde uma leve alteração reversível até a sua completa perda, dependendo da severidade do estresse. Então, são necessárias condições de baixo nível de oxigênio para a sua perfeita atividade (Eady, 1980). Os organismos diazotróficos precisam regular o suprimento de oxigênio para prover ATP e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase contra seu efeito deletério. Dessa forma, esses microorganismos desenvolveram várias estratégias para limitar o acesso do oxigênio à nitrogenase como as modificações morfológicas tais como os nódulos nas leguminosas e os heterocistos nas cianobactérias (Reis & Teixeira, 2005).

Vitousek & Field (1999) descrevem um modelo simples de controle da fixação simbiótica de N_2 no nível de ecossistema onde existem 2 rotas de entrada de N, a precipitação (bastante lenta e influenciada principalmente por alterações antropogênicas no ciclo do N) e FBN, e duas rotas de saída, lixiviação e denitrificação do N em excesso, que não foi absorvido pelas plantas ou utilizado pelos microrganismos.

Grandes concentrações de N mineral nos solos geralmente reduzem a FBN e até mesmo inibem os processos relacionados, por exemplo, a formação do nódulo radicular em plantas da família Leguminosae (Tsai et al., 1998) ou a formação de heterocistos em cianobactérias (Starks et al., 1981). Fatores ligados à sazonalidade, em especial a variação de temperatura e umidade ao longo do ano, podem influenciar a atividade microbiana de decomposição da matéria

orgânica do solo, alterando a disponibilidade de N (Leiros et al., 1999). Onde o suprimento deste nutriente é baixo, fixadores de N_2 podem ser favorecidos, pois podem fixar N_2 , formando mais biomassa e crescendo mais rápido que seus competidores não fixadores de N_2 . Em contraste, onde o N é abundante, a FBN representa grande custo energético e os fixadores têm menor capacidade competitiva em relação às espécies não fixadoras (Houlton et al., 2008). Portanto, o estado nutricional do solo é um importante fator que influencia a FBN (Sylvester-Bradley et al., 1980; Roggy et al., 1999).

Apesar do conhecimento que se tem sobre a FBN para sistemas simbióticos entre leguminosas e rizóbios, principalmente em sistemas agrícolas, e sobre a FBN por cianobactérias, até o momento não há informações disponíveis sobre as taxas de FBN por estes organismos na Floresta Atlântica. Trabalhos em florestas tropicais apontam para uma baixa taxa de FBN em florestas primárias, intactas e maduras, e uma maior FBN em florestas que sofreram algum distúrbio e estão em processo de regeneração (Barron et al., 2011; Pons et al., 2007; Gehring et al., 2005). Os dados obtidos por este estudo contribuem com o conhecimento sobre o fluxo de N no ecossistema da Floresta Atlântica no sentido de estimar a entrada de N no sistema pela FBN por leguminosas e cianobactérias de vida livre.

Este trabalho esteve vinculado ao Projeto Temático Biota Gradiente Funcional (Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa dos Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, processo FAPESP 03/12595-7), que visa compreender variações de composição, estrutura e funcionamento através do estudo de 14 parcelas permanentes de 1 ha ao longo de um gradiente altitudinal na Serra do Mar.

2. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi detectar a ocorrência de nódulos radiculares de leguminosas e quantificar a sua atividade de FBN em duas diferentes formações de Floresta

Ombrófila Densa do Parque Estadual da Serra do Mar e avaliar o potencial de FBN por cianobactérias de vida livre em Floresta Ombrófila Densa Montana. Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, duas áreas de floresta com diferentes altitudes tiveram a ocorrência de nódulos radiculares de leguminosas e a respectiva atividade de FBN quantificada nas quatro estações do ano. Neste primeiro capítulo também foi testada a capacidade de nodulação de algumas estirpes de rizóbios isoladas de nódulos da própria floresta em *Inga sessilis*, uma espécie amplamente distribuída na Floresta Atlântica. O segundo capítulo quantificou a atividade de FBN por cianobactérias de vida livre na Floresta Ombrófila Densa Montana. Também foram feitas estimativas do potencial de FBN por estes organismos usando técnicas isotópicas.

Capítulo I

Ocorrência e atividade sazonal de fixação de nitrogênio de nódulos radiculares de leguminosas em duas faixas de altitude na Floresta Atlântica da Serra do Mar, SP, Brasil

3.1 Introdução

Espécies da Família Leguminosae podem formar simbiose com bactérias presentes no solo e que pertencem aos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (coletivamente chamadas de rizóbios). A FBN nesta simbiose é realizada pela enzima nitrogenase que é codificada, sintetizada e localizada na bactéria (Ludden, 2001).

Os rizóbios são bactérias obrigatoriamente aeróbicas e, durante a simbiose, localizam-se em estruturas vegetais especializadas chamadas nódulos, que são formados nas raízes de leguminosas, característica típica desta interação. Os nódulos têm a sua permeabilidade gasosa regulada pela planta hospedeira, mantendo um nível de oxigênio que basta para a respiração dos tecidos envolvidos, mas suficientemente baixo para evitar a inativação da nitrogenase (Shaw & Brill, 1977). Um fator que não permite o acúmulo de oxigênio nos tecidos simbióticos é a produção da heme-proteína legmoglobina, a qual está presente em altas concentrações (p.ex. 700 μ M em nódulos de soja). Esta proteína tem alta afinidade pelo oxigênio e também é responsável pela coloração rosada característica do interior dos nódulos (Ludden, 2001).

A formação do nódulo nas raízes de espécies de Leguminosas segue um padrão bastante específico. A infecção pelos rizóbios envolve quimiotaxia desses organismos para a raiz, em resposta à secreção de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e flavonóides pelas raízes. Os exudatos de raiz induzem a ativação de genes denominados *nod* nos rizóbios, esses genes induzem a síntese de fatores Nod. Os fatores Nod são liberados pelos rizóbios em contato com as raízes e estes fatores são reconhecidos por receptores nas células do pêlo radicular. Os fatores Nod induzem a produção dos nódulos através de modificações que envolvem a

deformação do pêlo radicular, a entrada da bactéria na ponta do pêlo e a divisão das células do córtex da raiz para a formação do primórdio do nódulo (Burriss, 1972; Mortier et al., 2012). Cordões de infecção crescem por esse primórdio liberando as bactérias no citoplasma das células hospedeiras circundadas por uma membrana peribacteriíode derivada do próprio vegetal (fig. 2). O primórdio nodular se desenvolve em um nódulo maduro e as bactérias, na sua forma endossimbiótica, são chamadas de bacteriíodes. A membrana peribacteriíode está envolvida no transporte dos produtos dos e para os bacteriíodes. Os bacteriíodes com essa membrana compõem então o simbiossoma (Mylona et al., 1995).

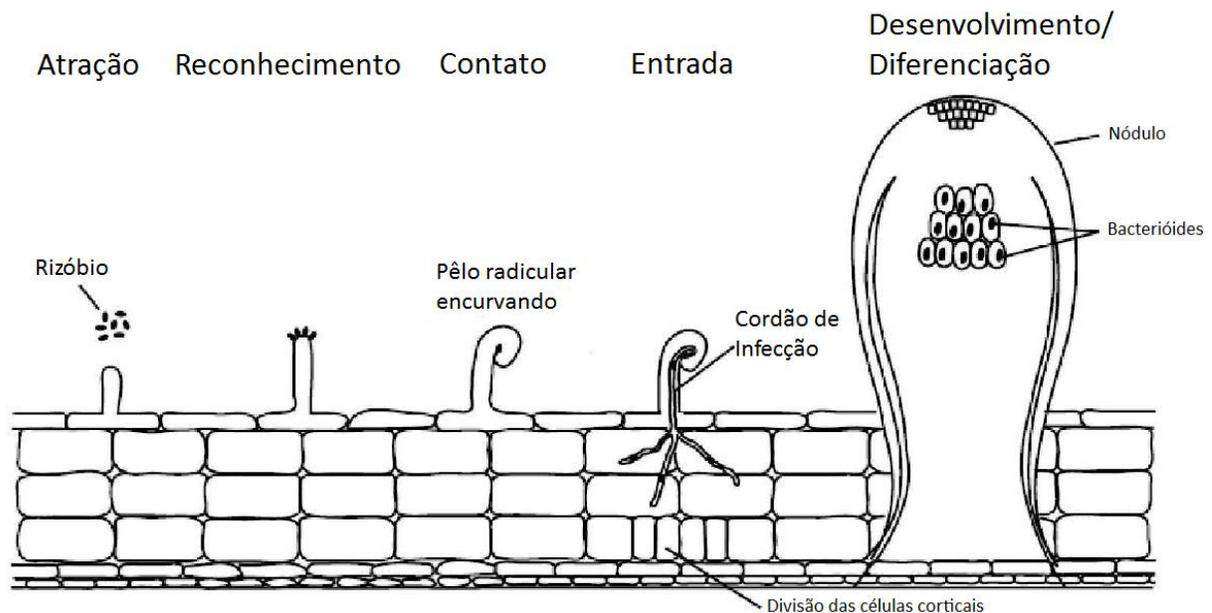


Figura 2. Processo de infecção e formação de nódulo radicular. Modificado a partir de Lum & Hirsch (2003).

Os nódulos permanecem ligados no sistema vascular da planta, o que permite receber fotoassimilados que são usados na reação de FBN e exportação dos compostos formados nesta reação para a planta hospedeira (Burriss, 1972; Debellé et al., 2001; D'Haese et al., 2000). O N_2 é fixado pelos rizóbios na forma de NH_4^+ que é transportado para a célula hospedeira onde é

assimilado e usado para a síntese de ureídeos ou aminoácidos para serem transportados para outros locais da planta (Schubert, 1986).

O que determina a forma dos nódulos é a hospedeira leguminosa, apesar da FBN ser determinada pela bactéria simbiote. Nódulos com crescimento determinado são esféricos e pequenos no tamanho (entre 2 e 5 mm) e tendem a transportar, como compostos nitrogenados derivados da FBN, ureídeos. Nódulos com crescimento indeterminado são formas mais comuns de nódulos, podendo apresentar várias ramificações em sua estrutura, variam entre 3 mm a vários centímetros de tamanho e costumam transportar amidas (Sprent, 2007).

Mimosoideae e Papilionoideae representam as subfamílias de Leguminosae com grande porcentagem de espécies nodulantes (54% e 62 %, respectivamente), enquanto Caesalpinoideae é a subfamília com menor percentual de espécies que nodulam (5%) (Faria & Lima, 1998; de Faria et al., 1989; Moreira & Franco 1994; Sprent, 2005; ter Steege et al., 2000). Dependendo das condições ambientais, várias espécies de leguminosas deixam de estabelecer uma simbiose eficaz com os rizóbios, ou mesmo não a fazem em condições naturais (Souza-Moreira et al., 1992). Estudos apontam por uma deficiência de nodulação em espécies que potencialmente poderiam nodular (Döbereiner & Campelo 1977, Magalhães et al., 1982).

A diversidade microbiana da Mata Atlântica é pouco conhecida (Bruce et al., 2010; Cassetari, 2011). Estudos têm mostrado que existe um pequeno número de espécies de bactérias nodulíferas descritas e um grande número de espécies de leguminosas capazes de formar nódulos. Esse fato se dá, na maioria das vezes, devido à capacidade de algumas estirpes de rizóbio formarem simbiose com diversas leguminosas diferentes (Moreira et al., 1998; Cassetari, 2011).

A FBN por Leguminosas é mais importante em áreas perturbadas do que em florestas naturais (Faria et al., 1984; Sprent, 1987; Gehring et al., 2003). McKey (1994) sugere que a FBN ocorrerá somente em períodos de menor disponibilidade de N no solo. Barron et al. (2011),

estudando uma floresta tropical, encontrou proeminente FBN em áreas perturbadas de floresta, e valores próximos a zero em florestas maduras, mesmo na presença de leguminosas.

Quando se trata de avaliar as possíveis diferenças existentes na FBN em vegetações com diferentes altitudes, os trabalhos relacionados a este tema foram realizados em ambientes alpinos com altitudes acima de 2000 metros (Johnson & Rumbaugh, 1986; Holzmann & Haselwandter, 1988; Jacot et al., 2000). Estes trabalhos detectaram diminuição da taxa de FBN visto a diminuição da temperatura do solo como o aumento da altitude, mas a FBN ainda é presente, resultante de processos de adaptação das leguminosas e seu simbiote às condições locais.

Os objetivos específicos deste capítulo foram caracterizar a ocorrência de nódulos e mensurar a atividade de sua enzima nitrogenase pela técnica da redução do acetileno em duas diferentes fisionomias de floresta nas quatro estações climáticas do ano. Estimar o potencial de contribuição da FBN nas diferentes fisionomias de floresta. Testar a capacidade de nodulação de algumas estirpes de rizóbios isoladas da área de estudo.

3.2 Material e métodos

3.3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em duas parcelas (parcela “E” e “N”) de 1 ha cada, no Parque Estadual da Serra do Mar (PESM). A parcela “E” correspondeu à área de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (FTB) e está localizada a aproximadamente 20 m da margem direita do Rio da Fazenda, no Núcleo Picinguaba (fig. 3), Ubatuba, a 23°20’03”S e 44°49’56”W, numa altitude que varia de 64 a 89 m acima do nível do mar. O clima regional é tropical úmido, sem estação seca (Setzer, 1966), com uma precipitação média anual superior a 2200 mm. Mesmo nos meses mais secos, junho a agosto, a precipitação média mensal nunca é inferior a 80 mm (fig. 4A) (Martins, 2010; Campos et al., 2011). A parcela “N” corresponde à área de Floresta

Ombrófila Densa Montana (FM), com altitude variando entre 1010 e 1044 metros sobre o mar e está localizada no Núcleo Santa Virgínia (fig. 3) no município de São Luis do Paraitinga, a 23°17' a 23°24'S e 45°03' a 45°11'W. O clima regional é tropical temperado, sem estação seca (Setzer, 1966), com uma precipitação média anual superior a 2000 mm. Mesmo nos meses mais secos, junho a agosto, a precipitação média mensal dificilmente é inferior a 60 mm (Padgurschi et al., 2011; Martins, 2010) (fig. 4B).

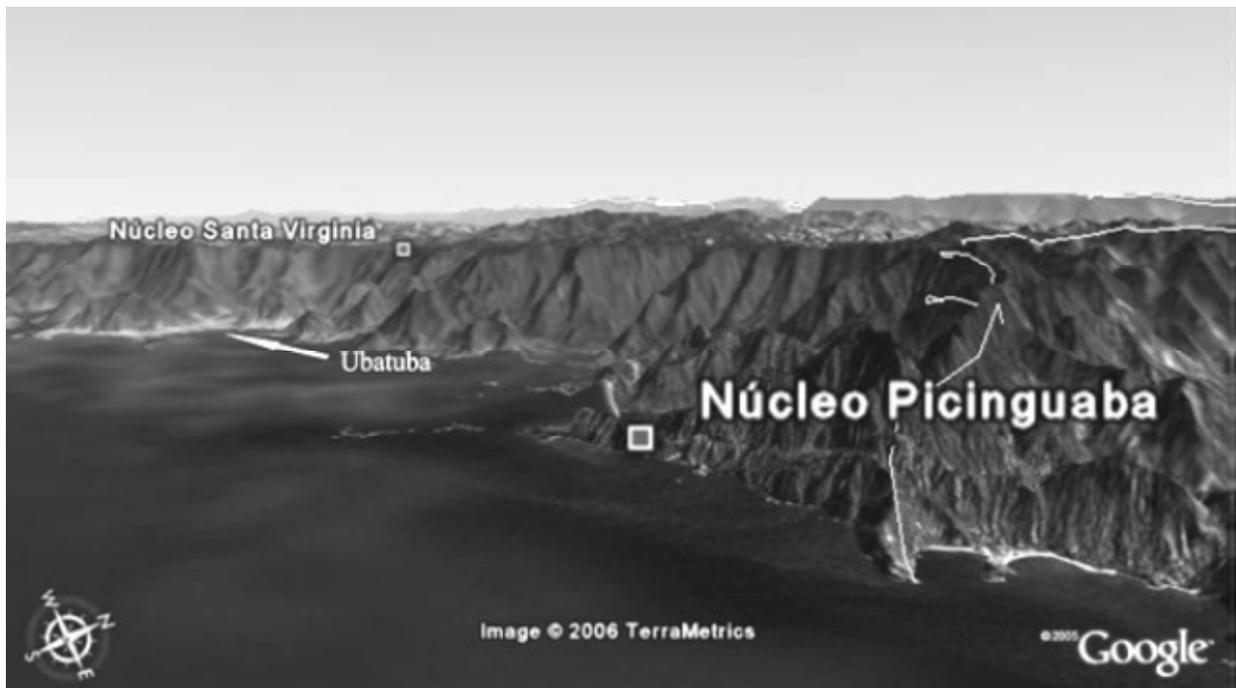


Figura 3 – Localização do núcleo Picinguaba – ao nível do mar – e do núcleo Santa Virgínia – no Planalto Atlântico. Extraído do 3º Relatório do Projeto Temático Biotá Gradiente Funcional, Figuras parte 6 - Adaptado de GOOGLE EARTH, 2005.

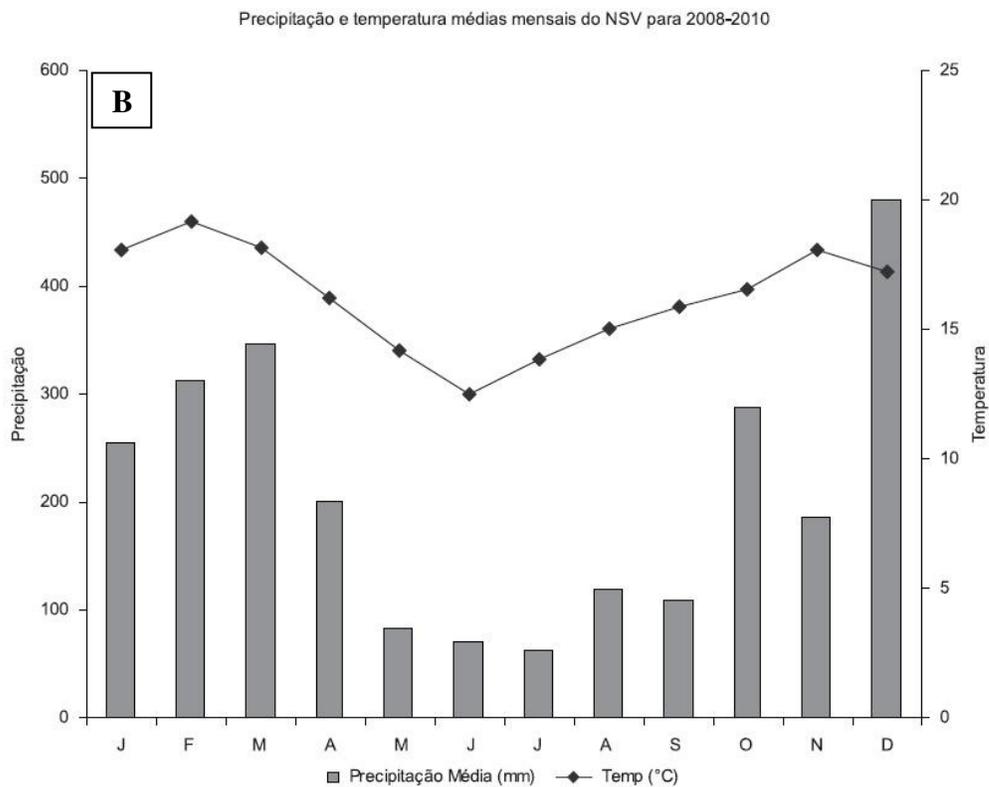
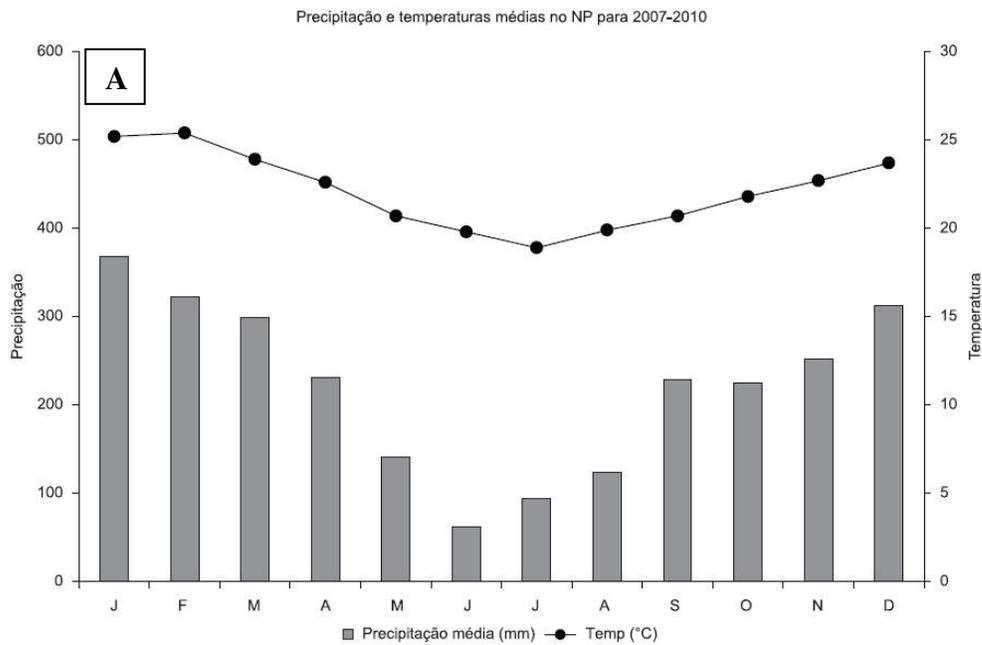


Figura 4. Temperatura média e precipitação média mensal no Núcleo Picinguaba (A) e Núcleo Santa Virgínia (B) do Parque Estadual da Serra do Mar, município de Ubatuba (Extraído de Joly et al., 2012).

3.2.2 Delineamento amostral para determinação da ocorrência de nódulos

A investigação para verificar a ocorrência de nódulos foi realizada sazonalmente (no inverno e primavera de 2009 e verão e outono de 2010).

Para amostrar a ocorrência de nódulos radiculares de leguminosas, cinco linhas de 100 m de comprimento foram tomadas como transectos. Para cada linha foram feitos 10 pontos de amostragem a cada 10 m, totalizando 50 pontos. Além destes, duas regiões da parcela foram escolhidas aleatoriamente para serem feitos mais 15 pontos de amostragem aleatórios (Fig. 5).

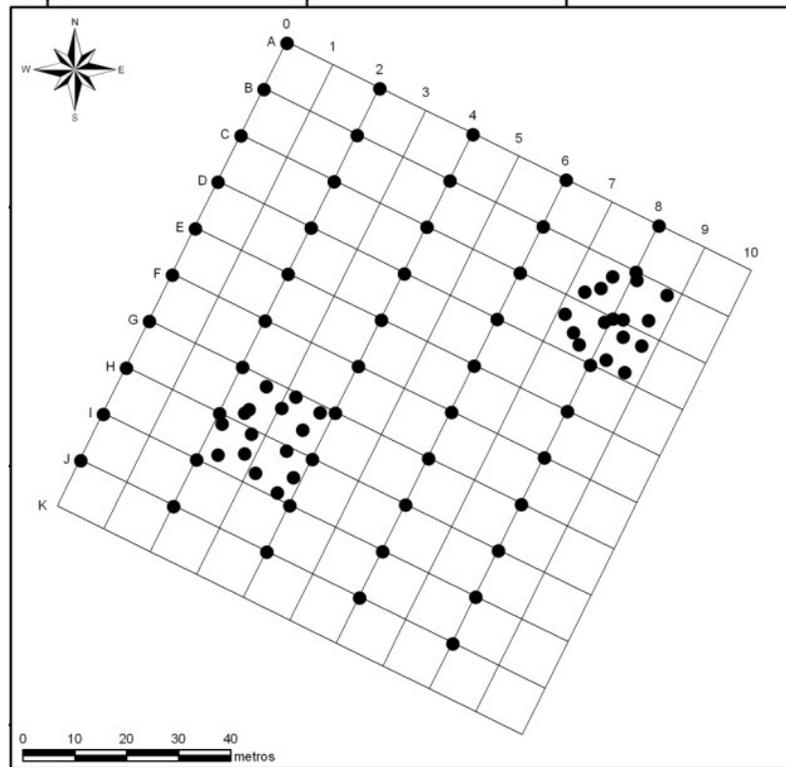


Figura 5 - Representação esquemática dos pontos de coletas nas parcelas. Linhas com pontos representam os transectos de coleta não aleatórios. Agrupamentos de pontos correspondem à coleta aleatória.

Nos pontos de amostragem, foram feitas coletas de solo com o auxílio de um trado cilíndrico para retirar uma amostra de aproximadamente 2000 cm³, abrangendo uma profundidade de 20 cm (fig. 6). Essa amostragem é considerada ideal já que raramente são encontrados nódulos em profundidades maiores (Pearson & Vitousek, 2001).

O solo foi cuidadosamente retirado do trado e colocado em uma bandeja para realização de triagem em busca de nódulos radiculares (figs. 6C e 6D). Todas as raízes presentes foram verificadas quanto à presença de nódulos.

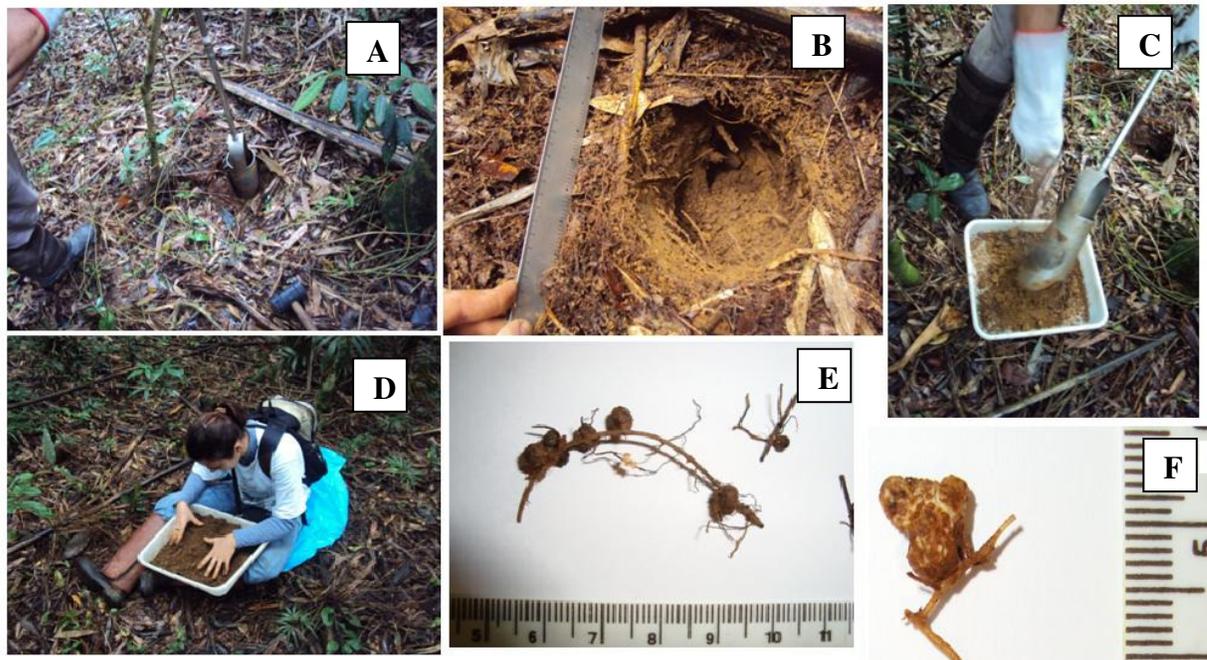


Figura 6. Processo de coleta e triagem das amostras de solo (A, B, C e D). Nódulos radiculares encontrados (E e F).

A cada coleta, tomou-se o cuidado de se distanciar alguns centímetros do ponto onde tinha sido feita a retirada da amostra na estação climática anterior. Alguns pontos de coleta que apresentaram nódulos em todas as estações climáticas foram escolhidos para terem as raízes seguidas por processo de escavação do solo na tentativa de localizar seu indivíduo arbóreo.

3.2.3 Avaliação da atividade da enzima nitrogenase dos nódulos radiculares

Quando nódulos radiculares foram encontrados, iniciou-se no campo o processo de medição da atividade de sua enzima nitrogenase através da atividade de redução do acetileno. A Atividade de Redução de Acetileno (ARA) foi desenvolvida por Hardy et al. (1968), e apesar de ser um método indireto de medição, é sensível e bastante conveniente para se determinar a atividade da enzima nitrogenase e é amplamente utilizada tanto em trabalhos de campo, quanto de laboratório (Burris, 1972; Holzmann & Haselwandter, 1988; McNabb & Geist, 1979; Yamada, 2006; Zackrisson et al., 2004; Barron et al., 2011). Essa característica de reduzir outras substâncias além do N_2 , como o acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4), é comum a todos os organismos fixadores de N_2 . Após incubação com C_2H_2 , o etileno gasoso no meio de incubação pode ser detectado e quantificado por cromatografia gasosa e servir de indicativo da atividade da nitrogenase. É uma forma de medição indireta, pois apesar de estar reduzindo o C_2H_2 , a nitrogenase, em condições naturais, estaria transformando o N_2 gasoso presente no meio, em compostos nitrogenados utilizáveis pelas plantas.

As raízes noduladas foram recortadas nos trechos onde os nódulos estavam inseridos, deixando aproximadamente 1 cm de raiz em torno do nódulo (figs. 6E e 6F) para não causar danos. Os nódulos foram rapidamente lavados com água destilada, secos em papel absorvente e submetidos à atividade de redução de acetileno. Os nódulos encontrados em cada ponto foram colocados dentro do mesmo frasco de vidro de 40 mL, tomando o cuidado para que não ocupassem mais que 40% do volume interno. Os frascos foram hermeticamente fechados e retirou-se, com uma seringa comum, 10% do volume gasoso que foi repostado pela mesma quantidade de gás acetileno puro (White Martins®). Os frascos foram incubados durante um período de 1 h. Após este período, 10 mL do volume gasoso foi transferido para recipientes com vácuo (Vacutainers®) de 10mL. Duas amostras sem nódulos foram utilizadas como brancos (adaptado de Swift & Bignell, 2001). Posteriormente, os nódulos foram quantificados, pesados e fotografados.

Os Vacutainers® foram levados até o Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp e com uma seringa *gas tight* (Sigma-Aldrich®), uma alíquota de 0,5 mL de amostra da composição gasosa do interior dos frascos foi retirada e injetada no cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 14-B). O gás de arraste foi o nitrogênio, a um fluxo de 20 mL min⁻¹. As temperaturas mantidas no aparelho eram de 80°C para a coluna, 100°C no injetor e 150°C no detector. Como padrão foi utilizado etileno puro (1 µL L⁻¹), da White Martins®. As avaliações quantitativas do etileno produzidas no interior dos frascos foram feitas a partir da comparação com o padrão de etileno e os dados foram convertidos em micro moles (µmoles) de etileno liberados por amostra. Os resultados foram expressos em µmoles de etileno formado pelo total de nódulos presentes no ponto coletado.

3.2.4 Análise dos dados

Os dados de ocorrência de nódulos e atividade da enzima nitrogenase, não apresentaram distribuição normal mesmo após várias tentativas de transformação dos dados, sendo analisados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%. O Teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) foi utilizado para verificação de variação entre grupos. As análises foram feitas com o auxílio do software Statistica 5.0 (StatiSoft Inc., 1999).

Foi necessário o uso de técnicas de interpolação espacial para estimar o valor da atividade da enzima nitrogenase para todo o hectare das parcelas estudadas. O desenho experimental da coleta foi originalmente pensado para poder ter os valores da amostragem extrapolados para todo o hectare através do emprego desses cálculos geoestatísticos, que determinam valores para locais desconhecidos desde que estejam entre locais com valores conhecidos, denominado interpolação. Por este processo, uma superfície que contenha as propriedades estatísticas dos dados coletados pode ser criada (Mueller, 2012).

A escolha do interpolador espacial é especialmente importante em regiões montanhosas com poucos dados, onde os valores das variáveis podem mudar em pequenas escalas de distância (Apaydin et al., 2004). Dos valores medidos, fórmulas matemáticas específicas são empregadas para determinar a amplitude da similaridade ou o grau de atenuação (p.ex.: Função de base radial ou *Splining*) (Esri, 2004). Os interpoladores determinísticos incluem um grupo de métodos de predição de superfícies baseados nas medidas do entorno (Mueller, 2012) e são extensivamente utilizados em investigações do solo (Xie et al., 2011). *ROOT-MEAN-SQUARE ERROR* (RMS) é uma medida estatística de quão próxima a predição dos valores estão dos valores medidos. Através dele, os interpoladores que apresentarem os menores valores de erro são selecionados (Xie et al., 2011; Mueller, 2012). Então, foi utilizada a função de base radial que é um interpolador exato e que prediz valores acima ou abaixo dos valores medidos.

A estimativa dos valores da atividade da enzima nitrogenase para toda a área da parcela foi feita utilizando o método de interpolação espacial do tipo determinístico que através do RMS identificou um erro de predição da ordem de 0,04. Baseado neste valor foi selecionado a interpolação espacial do tipo determinística através da função de base radial do tipo *Completely Regularized Spline*.

Uma vez que todos os pontos de coleta tinham seu posicionamento geográfico dentro da parcela, foi possível a obtenção de um gráfico de dispersão que foi utilizado para a criação de mapas de superfície no programa ArcGIS versão 9.2 (ESRI®). Este mapa de superfície foi preenchido com os valores da atividade da enzima nitrogenase dos pontos amostrados dentro das parcelas e os valores estimados para os pontos não amostrados. A partir da superfície formada, foi possível estimar as taxas de atividade da enzima nitrogenase para todo o hectare coletado.

Os valores obtidos pela interpolação espacial foram convertidos em gramas de N₂ fixado através do índice de 1.6:1 (μmol etileno produzido para μmol de N₂ fixado) (Barron et al., 2011). Trabalhos mostraram que o período médio da atividade da enzima nitrogenase em nódulos radiculares de leguminosa acompanha o número de horas de radiação solar do dia (Ayanaba &

Lawson, 1976; Balandreau et al., 1974; Bergersen 1970; Carran et al., 1982; Eskew & Ting, 1978). Assim os valores foram multiplicados por 12 e posteriormente multiplicados pelo número de dias correspondente a cada estação. Os valores das estações foram somados para a estimativa anual da FBN.

3.2.5 Determinação da capacidade nodulífera de isolados de rizóbio em casa de vegetação

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação para determinação da capacidade nodulífera de estirpes de rizóbios advindos das parcelas coletadas. Os inoculantes utilizados foram provenientes de meios de culturas compostos pelos rizóbios provenientes de nódulos coletados em campo e que foram previamente identificados por Cassetari (2011). Foram utilizados seis isolados provenientes de nódulos encontrados nas parcelas do PESH. Três desses isolados provenientes da espécie arbórea *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (Mimosaceae) e três de origem indeterminada. Também foram usados quatro inóculos contendo estirpes referências de rizóbio recomendadas pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (tab. 1).

Tabela 1. Espécie de rizóbios dos inoculantes e sua origem.

Espécie	Origem
<i>Bradyrhizobium</i> sp1	<i>Inga sessilis</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp2	
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium</i> sp1	Indeterminada
<i>Bradyrhizobium</i> sp3	
<i>Bradyrhizobium</i> sp4	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli	RELARE
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	
<i>Rhizobium tropici</i> , type IIB	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	

Para a preparação do inoculo, os rizóbios que foram inicialmente mantidos em placas contendo meio de cultura sólido YMA (Fred & Waksman, 1928) com azul de bromotimol como indicador de pH. Com uma alça de platina, colônias isoladas dos meios de cultura sólidos foram transferidas para meios de cultura líquidos e incubados a 28°C por períodos que variaram entre 2 e 4 dias. O inóculo foi considerado pronto para a aplicação na planta quando o meio de cultura se apresentou turvo e/ou com mudança de coloração devido à mudança de pH resultante do crescimento bacteriano e indicado pelo composto azul de bromotimol.

A inoculação foi realizada em plantas *Inga sessilis* provenientes de germinação de sementes coletadas no mês de Julho de 2010 no Núcleo de Santa Virgínia (PESM). Após a remoção manual da sarcotesta, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 min e depois lavadas em água corrente abundantemente. A germinação foi realizada em bandejas com vermiculita, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, em câmara de germinação do tipo BOD. Plantas com protrusão da radícula maior que 3 cm foram transferidas para vasos de 3 L contendo apenas vermiculita de granulometria fina. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e receberam solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) sem N a cada 5 dias (200 mL por vaso), e durante um período inicial de 3 meses.

Foram estabelecidos 3 tratamentos (n=8) e cada um recebeu soluções nutritivas baseadas na solução de Hoagland & Arnon (1938), contendo diferentes quantidades de N (2, 4 e 8 mM de N, respectivamente na forma de NH_4NO_3) e uma solução -N (sem nitrogênio). O pH das soluções foi corrigido em torno de 6,0 e 6,5 antes da aplicação. Essas soluções eram preparadas com macro e micronutrientes, exceto o ferro que foi adicionado às soluções apenas no momento da aplicação. Para isto, acrescentava-se à solução, 1ml L^{-1} de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo Fe-EDTA ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (33,2 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25 g/L) e NaOH (3,65 g/L). O tratamento controle não recebeu nenhum tipo de solução nutritiva, somente água pura.

Para os vasos dos tratamentos inoculados, foram aplicados 6 mL do respectivo inóculo pronto na superfície do substrato. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com intervalos de 15 dias.

No final da experimentação, foi verificada a forma dos nódulos, se do tipo determinado ou indeterminado e a atividade da enzima nitrogenase para constatar se estes estavam funcionais. As diferenças na capacidade de nodulação foram apresentadas em porcentagem.

3.3 Resultados

3.3.1 Ocorrência de nódulos e atividade da enzima nitrogenase

Para a amostragem de 80 pontos na parcela de 1 ha da Floresta de Terras Baixas, 13, 11, 13 e 10 pontos apresentaram nódulos no inverno, primavera, verão e outono, respectivamente. Para a Floresta Montana, 2, 10, 4 e 6 pontos apresentaram nódulos no inverno, primavera, verão e outono, respectivamente. Os pontos de ocorrência dentro de cada parcela nas diferentes estações mais a respectiva atividade da enzima nitrogenase do total de nódulos de cada ponto estão apresentados na figura 7.

Dos pontos amostrados, dois pontos da parcela da Floresta Ombrófila de Terras Baixas e dois pontos da Floresta Ombrófila Densa Montana apresentaram nódulos em todas as estações, indicando que o indivíduo da família Leguminosa se manteve nodulando nas diferentes estações. Destes pontos na FTB, um teve a raiz nodulada seguida, através de escavação do solo, até seu indivíduo arbóreo. A escavação se deu por aproximadamente 20 m. O indivíduo encontrado estava fora dos limites da parcela, próximo à margem direita do Rio da Fazenda. Foi então necessária a sua coleta, identificação e posterior herborização de um exemplar no Herbário da Universidade Estadual de Campinas – UEC (UEC032841, Acesso nº 158459, link do registro virtual: <http://floras.cna.unicamp.br/UEC/image/UEC032841.JPG/Zoom?width=760px&height=760px>). Tratou-se de um *Inga sessilis* com aproximadamente 24 m de altura. Houve a tentativa de

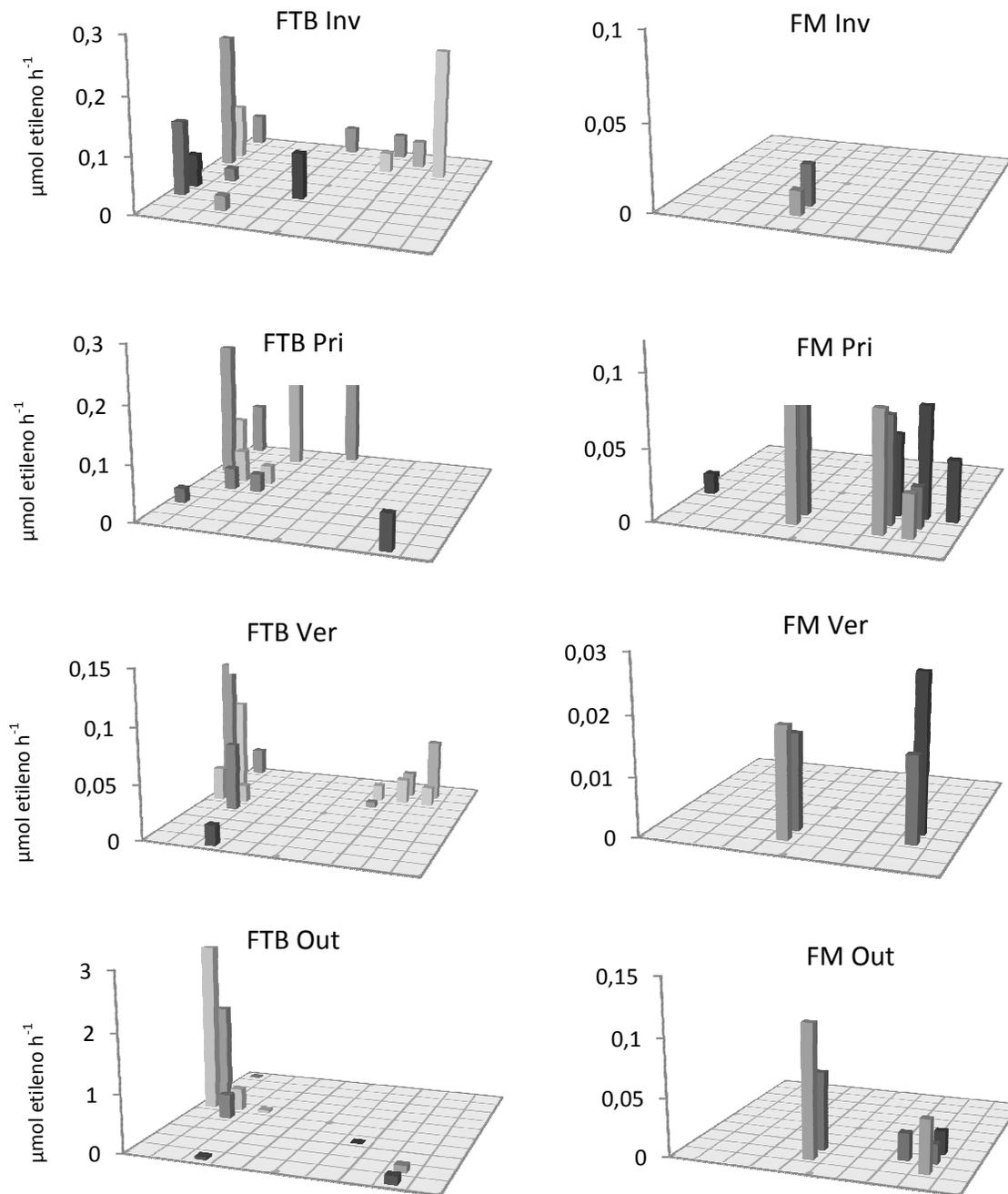


Figura 7. Distribuição espacial dos pontos com nódulos dentro das parcelas de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (FTB) e Floresta Ombrófila Densa Montana (FM) no inverno (Inv.), primavera (Prim.), verão (Ver.) e outono (Out.). Eixo y: atividade da enzima nitrogenase dos nódulos encontrados expressa em $\mu\text{mol etileno h}^{-1}$; Eixo x e z: distribuição dos pontos com nódulos na parcela de 1 ha.



Figura 8. A: Dossel da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas evidenciando com círculo vermelho a copa do indivíduo arbóreo de *Inga sessilis*. Foto tirada do chão; B: Zoom na copa, evidenciando as folhas típicas do gênero; C: Escavação da raiz até o indivíduo arbóreo; D: Caule evidenciando a marcação deste indivíduo; E: Trecho da raiz desta árvore com a presença de nódulos.

escavação para busca da outra leguminosa que manteve raiz nodulando dentro da parcela nas estações coletadas, mas não houve sucesso devido às dificuldades do local e grande extensão da raiz. Na FM, dois pontos com as raízes nodulando em todas as estações eram próximos e escavações das raízes levaram ao mesmo indivíduo arbóreo que já tinha sido identificado pelo Projeto Temático Biotá Gradiante Funcional e também tratou se de um *Inga sessilis*, localizado dentro da parcela e devidamente marcado com o código N0631 (fig. 8).

Os nódulos encontrados apresentaram variações no tamanho (Anexo 1), na forma (determinada ou indeterminada) e no número encontrados por pontos. A quantidade encontrada na FTB para o outono, inverno e primavera não apresentaram variação. Somente para o verão que os números de nódulos foram significativamente menores ($p < 0,05$). Para a FM, o número de nódulos foi muito baixo no inverno e na primavera e outono o número de nódulos foi

significativamente maior que para as demais estações ($p < 0,05$). Foi encontrado maior número de raízes de leguminosas nodulando na FTB em comparação com a FM ($p < 0,05$) (Fig. 9).

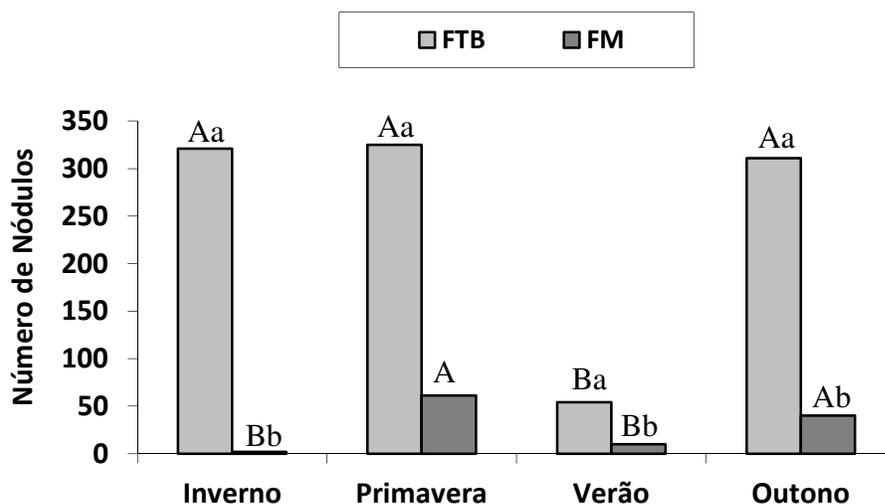


Figura 9. Número total de nódulos amostrados para cada fitofisionomia nas diferentes estações do ano. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre número de nódulos de uma mesma parcela para as várias estações; letras minúsculas representam diferenças significativas entre as parcelas na mesma estação (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Os valores médios da atividade da enzima nitrogenase dos nódulos para o verão na FTB foi significativamente menor que para as outras estações ($p < 0,05$). Houve uma maior atividade no outono seguida de uma gradativa diminuição ao longo das estações subsequentes. A FM não apresentou este padrão, mas os valores de atividade no verão também foram os menores. Já os valores do inverno, primavera e outono não diferiram significativamente (fig. 10). Os valores da atividade da enzima nitrogenase na FTB foram maiores em todas as estações em relação à FM ($p < 0,05$).

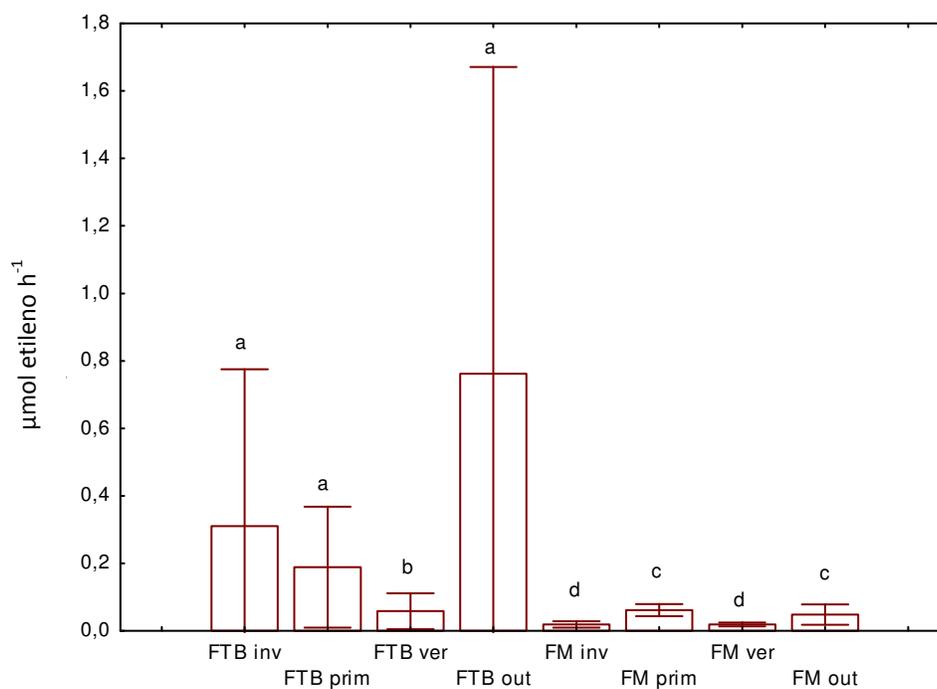


Figura 10 – Gráfico mostrando média e erro padrão da atividade da enzima nitrogenase dos nódulos ($\mu\text{mol etileno h}^{-1}$). Letras iguais representam similaridade estatística; letras diferentes representam variação segundo o teste não-paramétrico de Mann-Whitney a um nível de significância de 5%.

Uma análise comparativa da atividade da enzima nitrogenase por grama de nódulo entre FTB e FM revelou que, apesar dos valores na FTB serem mais elevados, não houve variação significativa ($p=0,16$). Os valores estimados da atividade da enzima nitrogenase dos nódulos para toda a parcela, mostram que o outono apresenta os maiores valores para FTB e FM, seguidos do inverno, primavera e verão, e que a FBN da parcela FM representa apenas 11% da capacidade da parcela FTB (fig. 11). A estimativa de FBN é de $2,06 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para FTB e $0,230 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para FM.

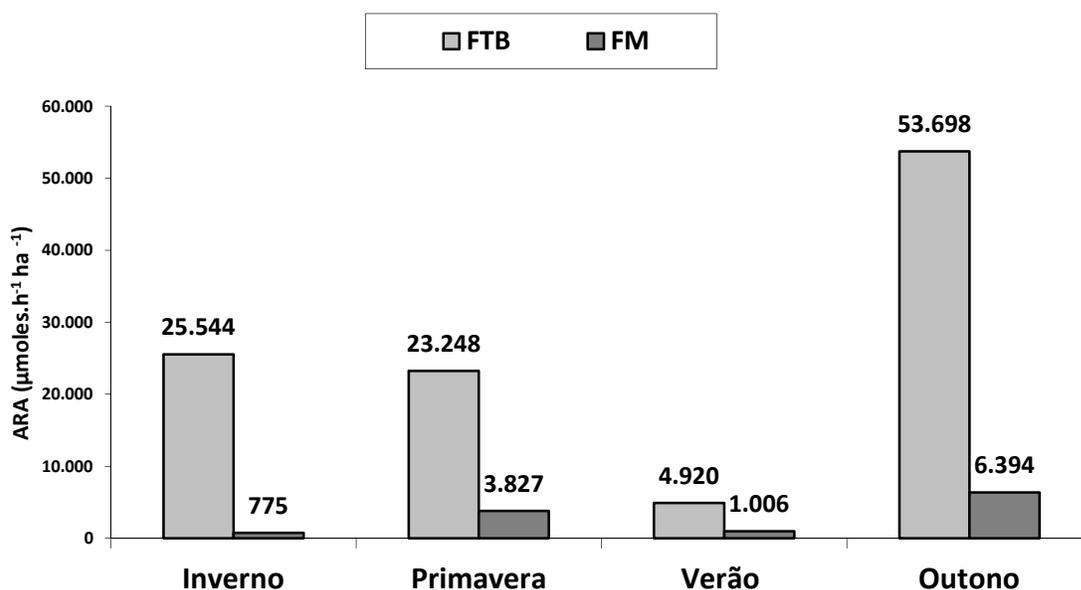


Figura 11. Valores estimados da atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{moles etileno h}^{-1} \text{ha}^{-1}$) por hectare nas diferentes estações do ano segundo a análise de interpolação espacial.

3.3.2 Análise da capacidade de nodulação em casa de vegetação

As plantas controle que não receberam solução nutritiva (Controle água pura) e controle que receberam solução nutritiva sem nitrogênio (Controle s/N), não apresentaram nódulos. Este fato confirma não ter havido contaminação por nenhum dos inoculantes ou mesmo isenta a possibilidade de ter alguma bactéria com capacidade nodulífera na água usada para a irrigação ou mesmo no vaso ou substrato utilizado. Todos os tratamentos inoculados com estirpes de rizóbio recomendadas pela RELARE tiveram plantas que formaram nódulos. Os três rizóbios isolados dos próprios nódulos de *Inga sessilis* tiveram sucesso na reinfecção. Somente *Rhizobium* sp1, proveniente dos isolados aleatórios da mata, não formou nódulos. Nenhum dos tratamentos inoculados que receberam solução nutritiva contendo 4 e 8 mM de N nodularam (tab. 2).

Tabela 2. Número de plantas noduladas pelos diferentes inóculos e suas respectivas soluções nutritivas.

Tratamento	Soluções Nutritivas					Total
	Água Pura	sem N	2mM N	4mM N	8mM N	
Controle	0	0	0	0	0	0
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>		2				2
<i>R. tropici</i> , <i>type</i> IIB		3				3
<i>B. elkani</i>		3				3
<i>B. japonicum</i>		2				2
<i>B. sp1</i>		3	1	0	0	4
<i>B. sp2</i>		1	2	0	0	3
<i>R. tropici</i>		2	1	0	0	3
<i>R. sp1</i>		0	0	0	0	0
<i>B. sp3</i>		1	2	0	0	3
<i>B. sp4</i>		2	5	0	0	7

n=8 para inóculos compostos por rizóbios provenientes da Floresta Atlântica e controles; *n*=7 para inóculos RELARE.

O baixo número de plantas que responderam a cada inoculante formando simbiose impossibilitou a análise estatística para detectar variações entre as respostas de atividade da enzima nitrogenase e de desenvolvimento. Mas, de maneira geral, a taxa de nodulação foi baixa. Considerando os tratamentos inoculados que receberam solução nutritiva sem N, *Rhizobium tropici*, *type* IIB e *Bradyrhizobium elkani* tiveram a maior porcentagem de plantas noduladas, 42,8%, seguidas do tratamento *Bradyrhizobium sp1* com 37,5%. Para as plantas recebendo solução nutritiva com 2 mM de N, *Bradyrhizobium sp4* apresentou uma porcentagem de 62,5%, seguidas de *Bradyrhizobium sp2* e *Bradyrhizobium sp3*, com 25%. Todos os nódulos formados eram do tipo indeterminado e apresentaram atividade da enzima nitrogenase (Anexo 3). Quando as plantas receberam somente água pura, foram observados sinais de deficiência mineral como clorose e senescência foliar, mas as plantas se mantiveram vivas até o final da experimentação.

3.4 Discussão

A FTB apresentou a maior quantidade de raízes noduladas em comparação com a FM. Mesmo que presentes em ambas as altitudes, as leguminosas expressaram sua capacidade de formar simbiose com rizóbios e fixar N_2 de forma diferente. Trabalhos realizados na área de estudo demonstraram que existe um forte controle altitudinal na concentração nutricional do solo. Há uma tendência dos solos da maior altitude serem mais ricos nutricionalmente que os solos da menor altitude (Martins, 2010) e possuírem maior concentração de NH_4^+ e NO_3^- (Sousa-Neto et al., 2011). Além dos solos da FTB conterem quantidades significativamente menor de N estes também apresentam maiores perdas deste nutriente por desnitrificação em comparação com a FM (Sousa-Neto et al., 2011). Estes fatos provavelmente relacionam-se com a maior ocorrência de nódulos na FTB em comparação com a FM. Nos solos com maior disponibilidade de N, as leguminosas podem apresentar capacidade de crescer sem fixar N_2 , na maior parte do tempo (Vitousek et al., 2002) e a FBN fica condicionada a ocorrer temporariamente nos períodos onde houver sinais de deficiência (McKey, 1994). Além disto, necessidades diferenciadas por outros nutrientes do solo como P, Fe, Mo, entre outros, são fatores que poderiam interferir na capacidade de FBN dos organismos (Vitousek et al., 2002). Mas o nutriente P não parece ser um nutriente limitante já que se apresenta em maior quantidade na FM em relação à FTB (Martins, 2010).

A família leguminosa apresentou nas parcelas estudadas, valor de importância fitossociológica de 14,10 para FTB (Campos, 2008) e 10,31 para FM (Pereira, 2011). Campos (2008) e Padgurschii et al. (2011) identificaram para as parcelas estudadas da FTB e FM, respectivamente, vários indivíduos arbóreos de leguminosas que são possíveis fixadores de N_2 . Varias outras espécies de leguminosas foram descritas ao longo de todo o gradiente altitudinal do PESM por Dias (2010), que também demonstrou que as leguminosas são mais aptas a ocupar a região de menor altitude, apresentando menor riqueza na área de maior altitude.

Os pontos onde a nodulação foi recorrente em todas as estações nas duas parcelas estudadas estavam relacionados com a espécie *Inga sessilis* que se mostrou ser um importante

fixador de N₂ para ambas as áreas estudadas. Em trabalhos de fitossociologia, esta espécie não apresentou grandes valores de importância fitossociológica na composição das espécies. Inclusive, não foi detectado nenhum indivíduo de *Inga sessilis* na parcela da FTB (Campos, 2008). O indivíduo arbóreo encontrado nodulando nesta área estava localizado fora dos limites da parcela. Já na parcela da FM, esta espécie mostrou-se presente, mas com valor importância fitossociológica de 0,45, considerado baixo para a área (Padgurschi et al., 2011). *Inga sessilis* também foi detectada em outras regiões estudadas da FM, com valor de importância fitossociológica de 1,34 (Padgurschi et al., 2011), 0,63 e 1,93 (Medeiros, 2009) e 2,36 (Marchiori, N.M, comunicação pessoal).

Inga sessilis foi considerada uma espécie secundária inicial (Medeiros, 2009) para uma diferente área estudada da FM. Sua presença e abundância em outras regiões da FM podem estar relacionadas com os diferentes estágios sucessionais destas áreas já que a vegetação do Núcleo Santa Virgínia sofreu, na década de 1960, corte raso e queima e, atualmente, apresenta-se sob forma de um mosaico composto por áreas de floresta madura, pastagens, plantios de *Eucalyptus* spp e florestas secundárias em diferentes idades de regeneração (Tabarelli & Mantovani, 1999). Mas Pereira (2010) sugere que o trecho de floresta onde se localiza a parcela estudada seja uma comunidade florestal madura.

Apesar de saber que leguminosas podem regular para menos (*down-regulation*) a formação de nódulos e a FBN em ambientes ricos em N (Heidin et al., 2009), nos pontos onde presente, *Inga sessilis* demonstrou ter capacidade de nodulação ao longo do ano para as duas áreas. Barron et al. (2011) também descreveram árvores deste gênero sempre nodulando em sua verificação sazonal em Barro Colorado e encontraram em floresta madura, um menor número de nódulos e menor atividade da enzima nitrogenase. Mas existem espécies que se mantêm fixando independente da condição de N do solo, mesmo que a sua disponibilidade seja alta (*over-fixation*) (Hedin et al., 2009; Menge & Hedin, 2009).

Os nódulos encontrados variaram em forma e tamanho. Os pontos coletados abrangidos pelas raízes de *Inga sessilis* ou onde a nodulação se manteve presente em todas as estações

podem conter nódulos mais longevos. Nódulos de forma determinada têm baixa longevidade, de apenas algumas semanas. Os nódulos de forma indeterminada são amplamente distribuídos pelas regiões do planeta e em sua estrutura têm meristema apical que pode garantir considerável longevidade por anos e em condições estressantes (Sprent, 2007). A tribo Ingae é relatada como tendo espécies uniformemente noduladas e com nódulos de crescimento indeterminado e com vários graus de ramificações em sua estrutura (Sprent, 2007).

Quando comparada a atividade média da enzima nitrogenase por grama de nódulos, não foram detectadas diferenças significativas entre as fitofisionomias. A variação na altitude entre as duas áreas de floresta é de aproximadamente 1000 m. Um reflexo da diferença de altitude seria a variação da temperatura entre as duas regiões. No inverno, as temperaturas mínimas médias são de 18°C para a FTB e 12°C para a FM. A atividade ótima da nitrogenase gira em torno de 25 °C (Houlton et al., 2008). Apesar disso, não foi detectada influencia da temperatura sobre a atividade da enzima. A altitude elevada costuma se mostrar como um fator que afeta esta atividade somente quando são maiores que 2000 m e que contribui para massiva diminuição da temperatura e/ou umidade do solo (Kessler et al., 1990).

As variações sazonais no número de nódulos e que refletem na atividade total da enzima nitrogenase podem estar relacionadas com a variação de precipitação e temperatura entre as estações. Estas variações podem interferir no processo de decomposição da matéria orgânica, que representa um processo chave na manutenção da fertilidade do solo. Dados mostram que a produção de serapilheira para as áreas estudadas foi maior na estação mais chuvosa (primavera e verão). Apesar de não haver estação seca na área de estudo, e sim uma estação mais chuvosa e outra menos chuvosa, a pluviosidade aumentada se mostra favorável à produção e decomposição de material vegetal (Martins, 2010). A decomposição de serapilheira é fortemente afetada pelas condições climáticas devido aos efeitos da temperatura e umidade (Aerts, 1997). Os meses mais quentes e úmidos para ambas as altitudes podem ter os processos de decomposição da serapilheira acelerados. A mineralização aumentada da matéria orgânica do solo nestes períodos libera N inorgânico (na forma de NH_4^+ e NO_3^-), constituindo fonte de N para as plantas

(Cantarella, 2007) e que dependendo da quantidade, podem afetar a FBN pelas leguminosas, não formando simbiose (Mortier et al., 2011; Ingestad, 1980; Olsen et al., 1975; Pate & Dart, 1961).

O ensaio da atividade de redução de acetileno (ARA) é uma técnica muito criticada por não detectar a atividade total da enzima nitrogenase, mesmo assim é um ensaio útil para determinar diferenças relativas na atividade da nitrogenase entre amostras desde que aplicados os métodos apropriados (Vessey, 1994). Fatores como danos causados pelo manuseio da raiz, destacamento do nódulo entre outros, são suficientes para causar diminuição na atividade da enzima, subestimando a FBN (Vessey, 1994). Sem a calibração da técnica de redução de acetileno com o ensaio isotópico do $^{15}\text{N}_2$, a quantidade de etileno formado não pode ser estimada com exatidão. Um importante passo para a investigação da FBN por leguminosas na área de estudo seria o emprego de técnicas de enriquecimento isotópico com ^{15}N para descobrir o real índice de conversão entre etileno formado pela ARA e o N_2 fixado.

Vários trabalhos apresentam estimativas de FBN por leguminosas utilizando o ensaio de redução de acetileno em consórcio com técnicas isotópicas (Kreibich et al., 2006; Barron et al., 2011; Jacot et al., 2000; Pons et al., 2006). Outros ainda mantêm-se usando somente a técnica de redução de acetileno como medida da atividade da nitrogenase (Rodríguez-Echeverría et al., 2012; González-Ruiz et al., 2008; Pearson & Vitousek, 2001).

A FBN não simbiótica por bactérias diazotróficas de vida livre também foram medidas para a mesma floresta e mostram padrão semelhante ao encontrado neste capítulo, com taxas maiores na FTB ($1,28 - 1,71 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) em relação à FM ($0,83 - 1,22 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) (Gómez & Lambais, 2011).

Vieira et al. (2011) estimaram o estoque de N para a floresta estudada, de $1,21 \text{ Mg N ha}^{-1}$ e $2,26 \text{ Mg N ha}^{-1}$ para FTB e FM, respectivamente, considerando o estoque de N da vegetação (biomassa viva e morta sobre o solo e biomassa de raízes). Os valores estimados de FBN pelas leguminosas para cada área correspondem a uma entrada anual de 0,2% e 0,01% dos estoques para FTB e FM, respectivamente. Os valores são baixos, mas Barron et al. (2011); Pons et al.

(2007); Gehring et al. (2005) também apontam baixos valores de FBN por leguminosas em floresta tropicais intactas. As estimativas de FBN não refletem a capacidades das espécies em fixar N_2 , pois a FBN é limitada pelos fatores ambientais, como a disponibilidade de N em florestas não perturbadas, que diminuem a necessidade de FBN. Entretanto, diante de possíveis distúrbios na floresta, onde houver substanciais perdas de N, a eficiente FBN pelo sistema simbiótico entre rizóbios e leguminosas pode ser um importante mecanismo para a restauração das reservas de N após o distúrbio (Pons et al., 2007).

Para o experimento de inoculação, as plantas que receberam solução nutritiva contendo 4 e 8 mM de N não formaram nódulos possivelmente porque essas concentrações mais elevadas de nitrogênio na composição da solução nutritiva inibiram a simbiose entre planta e rizóbio. Camargos (2007) verificou que grandes concentrações de N na solução nutritiva também inibem a formação de simbiose entre rizóbios e plantas de *Calopogonium mucunoides*. Barron et al. (2011) citaram em seu trabalho que para espécies do gênero *Inga*, a adição de nitrato diminui e inibe a FBN.

O objetivo inicial do experimento de inoculação era verificar a capacidade de nodulação e a eficiência simbiótica de isolados obtidos de nódulos de FTB e FM. O baixo número de plantas que formaram nódulos foi insuficiente para a aplicação de testes estatísticos para detectar qualquer variação. A eficiência simbiótica seria analisada através da atividade de redução de acetileno em associação com medidas de desenvolvimento como a altura, área foliar e massa seca. Para esta análise ser possível, seria necessária a repetição do experimento com alterações na metodologia, e como sugestão, modificações a maneira de aplicação do inóculo. Justino (2009), Xavier et al. (2006), Scheffer-Basso et al. (2001), tiveram sucesso na inoculação de outras leguminosas quando o inóculo foi fornecido no momento da transferência da semente germinada para o substrato. A imersão do sistema radicular no meio líquido do inóculo contendo as bactérias em suspensão, além da aplicação do inóculo na superfície do substrato, podem aumentar as chances de estabelecimento da simbiose.

No final da experimentação com plantas de *Inga sessilis*, observou-se que alguns cotilédones, apesar de enrugados e escurecidos, ainda se mantiveram fixados às plantas. Isto pode ter contribuído para a sobrevivência das plantas do tratamento que não recebeu solução nutritiva ao longo dos meses de experimentação.

A formação de nódulos desta espécie com as várias estirpes de rizóbio indica que *Inga sessilis* possui baixa especificidade com bactérias do grupo rizóbio. Todos os nódulos apresentaram atividade da enzima nitrogenase, indicando serem potenciais fixadores de N₂. Espécies como *Sesbania virgata* formaram simbiose com poucas espécies de bactérias, mostrando-se altamente específica quanto ao seu simbiote (Moreira et al., 2006). Cassetari (2011) isolou da parcela de FTB e da FM, 105 estirpes de bactérias presentes nos nódulos radiculares e conseguiu uma taxa de 88% de reinoculação em *Vigna unguiculata* que se apresentou como uma espécie de baixa especificidade. Apesar das estirpes estabelecerem eficiente interação com a leguminosa hospedeira, a FBN pode não ser eficiente (Wang et al., 2012). Para esta confirmação em plantas de *Inga sessilis*, seria necessário verificar parâmetros de desenvolvimento como o valor das massas secas dos vegetais em questão.

Inga sessilis apresentou-se fixando N₂ nas regiões de coleta no Parque Estadual da Serra do Mar e seu emprego em sistemas com importância econômica pode ser relevante. Um exemplo disto é em Chiapas, México, onde mais de 50% do café cresce em consórcio com árvores do gênero *Inga*. Esforços para aprimorar o crescimento e desenvolvimento destas espécies têm aumentado ultimamente, principalmente para a aplicação em sistemas de agroflorestas devido ao conhecimento da capacidade deste gênero em contribuir com a FBN (Grossman et al., 2005).

3.5 Conclusões

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que a taxa de nodulação e a atividade da enzima nitrogenase dos nódulos variou nas diferentes estações para ambas as áreas estudadas. A fisionomia de floresta localizada na menor altitude, FTB, apresentou os maiores valores de nodulação e atividade de FBN no outono e os menores valores no verão. A floresta de maior altitude, FM, apresentou os maiores valores no outono e primavera. A FTB possui maiores taxas de nodulação e FBN em relação à fisionomia localizada na maior altitude. Essas diferenças apontam para um funcionamento diferenciado entre as duas áreas de floresta quanto à entrada de N neste ecossistema. Os valores estimados de FBN pelas leguminosas para cada área correspondem a uma entrada anual de 0,2% e 0,01% dos estoques para FTB e FM, respectivamente. Em experimentação, cinco estirpes de rizóbios isolados da floresta estudada formaram associação simbiótica com *Inga sessilis*, que se mostrou uma espécie com baixa especificidade com seus hospedeiros, formando nódulos radiculares quando recebendo soluções nutritivas com baixa concentração de nitrogênio.

Capítulo II

Potencial de fixação de N₂ por cianobactérias de vida livre em Floresta Ombrófila Densa Montana

4.1 Introdução

As cianobactérias formam um grupo antigo e diverso de procariotos fotossintéticos, sendo os primeiros organismos a desenvolver a fotossíntese oxigênica e então mudar a atmosfera da Terra, originalmente anóxica (Adams & Duggan, 1999). Porém, como consequência da transformação da oxigenação da atmosfera terrestre, as bactérias que utilizavam a enzima nitrogenase na FBN foram confinadas a ambientes anaeróbicos, dado que essa enzima é altamente sensível ao oxigênio. Entretanto, as cianobactérias capazes de fixar o N₂ desenvolveram certas estratégias para proteger seu complexo enzimático da atmosfera aeróbica. Em um dos grupos houve a separação temporal entre a fotossíntese e a FBN e em alguns grupos filamentosos, houve a diferenciação de uma célula especializada, o heterócito, que provê um microambiente adequado para o funcionamento da nitrogenase (Adams & Duggan, 1999).

O heterócito, além de proporcionar condições para o bom funcionamento da enzima nitrogenase, também tem a função de abastecer todo o resto do filamento com os compostos nitrogenados formados pela FBN (Adams & Duggan, 1999). A criação do interior celular microaeróbico no heterócito requer uma série de modificações de uma célula vegetativa, como o aumento no número de camadas celulares contribuindo para a redução da difusão de gases, principalmente o oxigênio, a perda da atividade do fotossistema II, eliminando a produção de oxigênio, e a remoção dos traços de oxigênio que difundem para o interior da célula durante o processo de FBN (Adams & Duggan, 1999) (fig. 12).

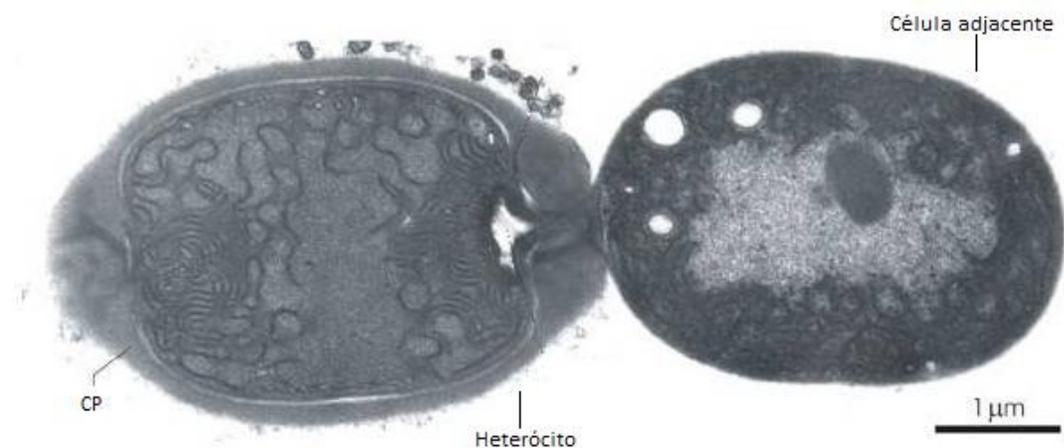


Figura 12: Heterócito e célula vegetativa adjacente. CP: camada de polissacarídeo do heterócito. Modificado de Flores & Herrero (2010).

A expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento dos heterócitos e FBN ocorre somente quando a fonte de nitrogênio no ambiente passa a ser limitada. Nos gêneros *Anabaena* e *Nostoc*, a presença de N inorgânico na forma de nitrato ou amônio pode inclusive reprimir o desenvolvimento desta estrutura. Assim, espécies fixadoras de nitrogênio são encontradas preferencialmente em locais com baixa quantidade de N no solo (Starks et al., 1981).

As cianobactérias ocupam habitats que incluem vastas áreas oceânicas, solos de regiões árticas, temperadas e tropicais, lagos de água doce e ambientes com condições extremas como áridos desertos, fontes termais e lagos congelados (Herrero et al., 2001) e também diversas formações vegetais. São responsáveis por significativa proporção do nitrogênio biologicamente fixado na Terra (Haselkorn & Buikema, 1992). Esta FBN é uma das principais entradas de nitrogênio em Florestas Boreais (DeLuca et al., 2008). Dojani et al. (2007) sugerem que a principal entrada de N nos solos próximos de afloramentos rochosos na Floresta Tropical da Guiana Francesa decorre de processos de lixiviação do N₂ fixado por cianobactéria e demonstram a importância dessa contribuição na estruturação do ecossistema. As

cianobactérias também são responsáveis por inserir importante quantidade de nitrogênio nas planícies alagáveis da Amazônia (Fiore et al., 2005).

Cianobactérias podem ser de vida-livre ou formar associações com fungos formando cianolíquens, os quais são importantes fixadores de nitrogênio na tundra (Alexander et al., 1978); em associação com briófitas, cycas, e com a angiosperma *Gunnera* (Bergman et al., 1992; Bergman et al., 1996; Meeks, 1998). Podem se agregar com partículas de solo, algas, fungos, líquens e briófitas, em diferentes proporções, e formar crostas biológicas que ficam nos primeiros milímetros da superfície do solo (Belnalp et al., 2001). Nestas crostas, as partes envolvidas se mantêm agregadas devido à presença e atividade desta biota, resultando em uma crosta viva aderida à superfície do solo.

A forma de vida crostosa tem pouca necessidade de umidade e sua capacidade de utilizar água de chuvas, neblina e orvalho as possibilitam a ocupar lugares onde o déficit de água limita o estabelecimento de plantas vasculares. Mas as crostas têm capacidade de crescimento limitado e não conseguem competir com plantas fanerógamas por luz. São de ocorrência comum em regiões árticas, temperadas e tropicais, desde que expostas ao sol, e desaparecem na falta de água ou em casos de distúrbio ambiental. Em microhabitats mais úmidos, cianobactérias e líquens representam o componente principal das crostas (Belnalp et al., 2001).

As cianobactérias, nas suas várias formas de vida, participam diretamente de vários processos biogeoquímicos do solo e influenciam suas propriedades físico-químicas. Os principais processos são a acumulação de matéria orgânica e nitrogênio e decomposição de minerais (Shtina & Hollerbakh, 1976). Outras funções ecológicas conferidas às cianobactérias terrestres são a redução da erosão pelo vento e pela água (Shtina & Hollerbakh, 1976; West, 1990; Rahmonov, 1999), dependendo das circunstâncias, a inibição ou promoção de germinação de sementes (Rahmonov, 2001), e a estabilização e melhoria das condições de umidade do solo (Yair, 2003; Eldridge, 2003).

Em casos de distúrbios em uma floresta, como a queda de uma árvore abrindo clareira ou uma erupção vulcânica, esses organismos são os primeiros a colonizar. E os estádios sucessionais da comunidade das crostas biológicas podem ser identificados. Grandes cianobactérias filamentosas colonizam primeiro, seguidas por cianobactérias menores e algas verdes. Após a estabilização da superfície do solo, aparecem os líquens e musgos. Em regiões temperadas e tropicais, esses organismos influenciam na formação do solo, assim como no restabelecimento de uma vegetação vascular, processos que podem durar décadas (Belnap et al., 2001).

Espécies do gênero *Nostoc* estão entre as cianobactérias mais amplamente distribuídas (Whitton & Sinclair, 1975), e muitas são reconhecidas pela sua capacidade de FBN. A dominância do gênero *Nostoc* é reportada para vários habitat terrestres (Olson et al., 1998). A predominância de *Nostoc* em certos habitat tem sido atribuída à sua capacidade de permanecer desidratada por meses e até anos, e então recuperar sua atividade metabólica em pouco tempo, questão de horas, após a reidratação; à sua habilidade de proteger superfícies de danos causados por raios solares; à sua resistência à predação devido à sua capacidade de formação de enormes colônias que cobrem extensas superfícies do solo e que são muito grandes para serem totalmente exterminadas por algívoros (Dodds et al., 1995).

A FBN por cianobactérias pode ser determinada de forma indireta pela atividade da enzima nitrogenase dos heterócitos ou de forma direta através de técnicas de isotopia. Existem dois isótopos estáveis do N (^{14}N e ^{15}N) e a média natural de abundância no ar desses isótopos é a constante de 99,63‰ e 0,3663‰ para ^{14}N e ^{15}N , respectivamente. A conversão de N_2 por FBN parece discriminar pouco contra ^{15}N , então a assinatura isotópica dos organismos fixadores de nitrogênio, quando estão fixando, tende a ficar próxima de 0‰ (Ehleringer & Rundel, 1989). Por outro lado, espécies que não são capazes de fixar N_2 atmosférico mostram grande variação na sua razão isotópica dependendo da taxa de mineralização do N no solo (Garten & Van Miegroet, 1994). Dessa forma, o $\delta^{15}\text{N}$ dos organismos pode ser usado pra determinar se a fonte de N é predominantemente de origem atmosférica ou oriunda do solo.

Tem-se muita informação em relação à FBN sobre as formas de vida livre de cianobactérias do oeste dos Estados Unidos, Austrália, Israel e Ásia, mas pouca informação sobre a ocorrência na América do Sul (Belnap, 2002). Isto pode estar relacionado com o fato de que algumas pesquisas se concentrarem em certas áreas onde estas formas de vida são mais importantes ou mais aparentes no ecossistema.

Poucos são os relatos de ocorrência de crostas biológicas de solo na América do Sul. Os registros são na savana úmida da Venezuela, no chaco argentino, no deserto chileno e na caatinga brasileira (Belnap et al., 2001). Outras formas de vida são descritas para a Floresta Atlântica como a maciça presença de cianobactérias vivendo na filosfera (superfície das folhas dos vegetais) (Gonçalves 2011) e a diversidade de biofilmes de cianobactérias crescendo sobre afloramentos rochosos (*inselbergs*) (Büdel et al., 2002). Mesmo assim, a flora de cianobactérias para ambientes terrestres brasileiros, inclusive da Floresta Atlântica, é quase totalmente desconhecida (Sant'Anna et al., 2007, Sant'Anna et al., 2011) e não se tem informação sobre a relação da presença das cianobactérias de vida livre e sua relação com a FBN na Floresta Atlântica.

O objetivo desse trabalho foi estimar a FBN por cianobactérias de vida livre num trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana. Os objetivos específicos foram comparar a FBN por cianobactérias de vida livre entre áreas de floresta intacta e áreas antropizadas para o inverno e verão, e estimar o potencial de FBN através do uso de técnicas isotópicas utilizando cepas de *Nostoc* sp isoladas da região estudada.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Coleta de cianobactérias no campo

O Núcleo Santa Virgínia foi escolhido como área de estudo por apresentar áreas com evidente ocorrência de cianobactérias de vida livre. Foram amostradas áreas na floresta intactas e áreas que sofreram remoção da vegetação. Nas regiões de floresta intacta, as cianobactérias ocorriam em locais expostos à radiação solar, como em rochas que margeavam e entremeavam alguns rios formando cachoeiras. As áreas amostradas que tiveram a vegetação removida são trechos onde foram construídas edificações para dar suporte administrativo e científico ao Núcleo. Nestas áreas há fluxo constante de pessoas e veículos e foram consideradas áreas antropizadas (fig. 13).

As coletas foram realizadas no verão (fevereiro de 2010) e no inverno (julho de 2010). No verão foram amostrados 13 pontos de ocorrência desses organismos e 12 pontos no inverno. As coletas foram realizadas entre as latitudes S 23° 19' e S 23° 20' e longitudes W 45° 05' e W 45° 09'. Cada ponto de coleta consistiu de uma área delimitada por um quadrado de 25 cm de lado (fig. 15). Dentro desta área foram retiradas 4 fragmentos de colônia que tiveram suas áreas medidas com o auxílio do programa ImageJ 1.42q (Rasband, 2010).



Figura 13. Imagem de satélite mostrando áreas onde a vegetação do Núcleo Santa Virgínia foi retirada. A: Base Itamambuca; B: Sede Administrativa. Polígonos amarelos evidenciam as áreas antropizadas. Fonte: Google, 2011.

4.2.2 Atividade da enzima nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi medida através da Atividade Redução de Acetileno (ARA) de acordo com Stewart et al. (1967). As amostras foram colocadas em frascos de vidro de 40 mL vedados hermeticamente com tampas com septos de silicone. Como as amostras foram coletadas diretamente do ambiente, ao serem colocadas nos frascos para a determinação da ARA, estas recebiam uma pequena quantidade de água destilada para recuperar a atividade metabólica de partes que pudessem estar desidratadas (Belnap, 2002).

Com uma seringa, uma porção de 4 mL do conteúdo gasoso interno do frasco foi removido e substituído por 4 mL de gás acetileno (C_2H_2). Os frascos foram deixados em incubação nos locais de coleta para a preservação das condições naturais de temperatura e radiação solar por um período de 24 horas. Posteriormente, 10 mL do conteúdo gasoso dos frascos foi transferido para frascos do tipo Vacutainers® de 10mL e levados para o laboratório para posterior análise por cromatografia gasosa. Dois frascos sem amostras foram feitos como brancos. A atividade foi expressa em mols 10^{-3} de etileno formados por metro quadrado por dia ($mmol\ etil\ m^{-2}\ d^{-2}$).

4.2.3 Estimativa da fixação de nitrogênio por técnicas de isotopia

A estimativa da FBN foi calculada a partir da obtenção de um índice de conversão entre os valores de atividade da enzima nitrogenase e quantidade de N_2 fixado. Cepas selecionadas de cianobactérias foram submetidas ao enriquecimento isotópico com $^{15}N_2$, analisadas quanto à abundância natural de ^{15}N e à atividade da enzima nitrogenase.

4.2.3.1 Cultivo

Para o cultivo, o material coletado em campo foi isolado no Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. As amostras passaram pelo processo de pescaria para o isolamento e purificação das cepas. O método de pescaria consiste em isolar indivíduos de uma única espécie através de sucessivas “pescagens”, como descrito a seguir.

Em uma lâmina flambada é colocada uma gota da amostra, que pode estar composta por mais de uma espécie, e várias gotas de meio de cultivo. Ao microscópio óptico (ocular de 10 e 20 x), com o auxílio de uma micropipeta, retiram-se organismos da gota da amostra que são transferidos para a gota com meio de cultivo limpo e assim sucessivamente, até que se obtenha apenas um organismo na gota. Após este procedimento, o indivíduo isolado é transferido para um tubo de ensaio com pequena quantidade de meio. Os tubos são então mantidos em sala de cultura com condições constante de temperatura (23 ± 1 °C), irradiância ($40-50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoper\u00edodo (14-10h claro-escuro). As cepas isoladas foram depositadas na Cole\u00e7\u00e3o de Cultura do Instituto de Bot\u00e2nica (CCIBt) sob os seguintes n\u00fameros de acesso: CCIBt 3290, CCIBt 3291, CCIBt 3292, CCIBt 3305.

Ap\u00f3s 30 dias as amostras foram transferidas para erlenmeyers contendo 500 ml de meio de cultura BG-11₀ (meio l\u00edquido sem nitrog\u00eanio, anexo 4) (Rippka, 1979), e deixadas em agitador de Kline para crescimento. Com o crescimento das culturas, estas foram sendo repicadas para frascos maiores e acrescentado mais meio l\u00edquido BG-11₀, at\u00e9 que se obtivesse biomassa suficiente para a realiza\u00e7\u00e3o dos experimentos.

Todo procedimento foi realizado em c\u00e2mara de fluxo laminar previamente esterilizada por meio de luz UV durante 30 min.

4.2.3.2 Técnicas de isotopia

Para o experimento com técnicas de isotopia, as células dos meios de culturas foram previamente concentradas por centrifugação durante 15 minutos a uma velocidade de 3000 RPM. O sobrenadante foi descartado. A biomassa fresca de cianobactérias foi separada em lotes de mesmo peso e ressuspendidas em 60 ml de novo meio de cultura BG-11₀ e colocados em frascos de vidro de 600 ml e deixados *over-night* em agitador e luz constante. Posteriormente, os frascos com as cepas em meio de cultura foram vedados hermeticamente e divididos nos seguintes ensaios que foram incubados simultaneamente por 2 h em agitador a 60 RPM e sob irradiância de 40-50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$:

- Dois frascos para enriquecimento com $^{15}\text{N}_2$;
- Dois frascos para avaliação da Abundância Natural de ^{15}N ;
- Dois frascos para avaliação da Atividade de Redução de Acetileno (ARA).

Para o ensaio de enriquecimento isotópico, cinco por cento do volume interno gasoso do frasco foi retirado e substituído pelo mesmo volume de gás $^{15}\text{N}_2$ da marca Aldrich® (99% de átomos de $^{15}\text{N}_2$). Os frascos para avaliação da abundância natural de ^{15}N não tiveram a composição gasosa alterada. No ensaio de ARA, os frascos tiveram 10% do volume gasoso interno retirado e substituído pela mesma quantidade de gás acetileno.

Após o período de incubação, os meios de cultura dos ensaios para determinação do enriquecimento e abundância natural foram centrifugados. O sobrenadante foi descartado. A biomassa foi colocada em placas de vidro, e levadas para serem desidratadas em estufa por 48 h a 60°C. As amostras foram moídas e transferidas para tubos do tipo Eppendorfs® e enviadas separadamente ao Centro de Energia Nuclear da Agricultura-CENA-USP para a análise isotópica em espectrômetro de massa (*Automated Nitrogen and Carbon Analysis - Mass Spectrometry - Solid and Liquid Sample*), modelo ANCA-MS-SL 20/20 *Stable Isotope Analyser*, com fluxo viscoso de ionização por impacto de elétrons, da Europa Scientific® (Atualmente da SERCON®). Após o

ensaio de ARA, 10 ml do volume gasoso dos frascos foram transferidos para tubos do tipo *Vacutainers*[®], e levados até a Unicamp, para análise por cromatografia gasosa.

A quantidade de N₂ fixado foi calculada usando a seguinte fórmula proposta por Liengen (1999):

$$X = \frac{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{excess}}}{100} \cdot \frac{\text{total N}_{\text{amostra}} \cdot 10^3}{t} \cdot \frac{100}{\% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{ar}}}$$

Onde:

X: mg N g ms⁻¹ h⁻¹ (ms: massa seca);

atom % ¹⁵N_{excess}: a diferença entre a porcentagem de átomos de ¹⁵N da amostra e do controle;

total N_{amostra}: quantidade de nitrogênio em da amostra (mg.100 g ms⁻¹);

t: tempo de incubação;

%¹⁵N_{ar}: porcentagem de ¹⁵N₂ do volume gasoso do frasco de incubação;

4.3 Resultados

4.3.1 Ocorrência

A ocorrência de cianobactérias foi registrada e classificada nas seguintes formas de vida:

- Cianobactérias coloniais (Co), formadas por colônias mucilaginosas de *Nostoc* sp.;
- Cianobactérias crostosas (Cr), formadas por associação de cianobactérias com outros organismos e solo.

Nas regiões de floresta intactas, ambas as formas de vida de cianobactérias ocorreram em áreas expostas ao sol onde não havia cobertura pelo dossel. Esses organismos estavam presentes sobre as rochas que circundam os rios. Nestes ambientes, Co encontravam-se presas

preferencialmente sobre as rochas das regiões mais úmidas que recebem um *spray* de água formado pelo impacto da correnteza com as rochas (figs. 14A e 14B). Já Cr, encontravam-se particularmente localizadas nas depressões das rochas, onde há um acúmulo de sedimentos e também nas áreas que permaneciam mais tempo ressecadas (figs. 14C e 14D). Foi verificado que durante as cheias dos rios, nos períodos mais chuvosos do ano, parte das Co e Cr foram arrancadas pela correnteza.

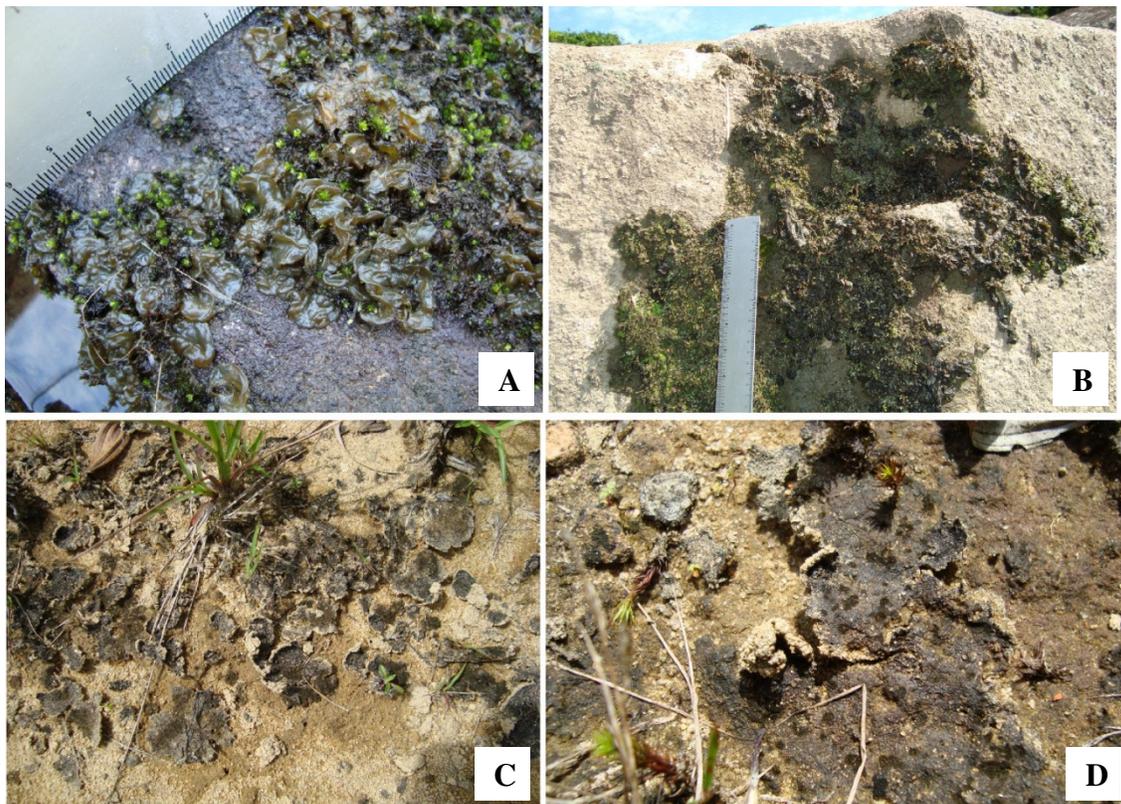


Figura 14. Formas de vida de cianobactérias presentes nas áreas não perturbadas do Núcleo Santa Virgínia. A e B: cianobactérias coloniais sobre rocha próxima ao Rio Pirapitinga; C e D: cianobactéria crostosa próximo ao rio Ipiranga.

As figuras 13A e 13B mostram áreas antropizadas do parque, constituídas pelas construções da base Itamambuca e da sede administrativa, respectivamente. A figura 15 mostra as formas de vida de cianobactérias que ocorrem de forma abundante nestas áreas.



Figura 15. Formas de vida de cianobactérias presentes nas regiões perturbadas do Núcleo Santa Virgínia. A: Crostosa; B: Colonial. Gabarito de madeira delimita uma área de 25 cm de lado.

Como não houve manutenção da área ao entorno da Base Itamambuca no período do estudo, foi possível observar que no início do ano de 2009 a predominância no local era de cianobactérias coloniais e que ao longo do tempo foi sendo substituída por cianobactérias crostosas e depois por vegetação herbácea até final de 2010.

4.3.2 Atividade da enzima nitrogenase

As análises foram feitas baseando-se nas formas de vida das cianobactérias coletadas, se Cr ou Co, e se presentes em locais onde a cobertura vegetal foi retirada (região degradada) (D) ou intacta (I) do Núcleo Santa Virgínia. Não houve coleta de Cr para locais I no verão. Os locais de coleta estão identificados na tabela 3.

Tabela 3. Locais de coleta para o verão e o inverno e valores médios da atividade da enzima nitrogenase para diferentes formas de vida de cianobactéria e condições locais de preservação no Núcleo Santa Virgínia – Parque Estadual da Serra do Mar, São Luiz do Paraitinga - SP.

Local	Forma de vida	ARA (mmol etil.m⁻². dia⁻¹)	Condição de preservação
<i>Verão</i>			
Cachoeira Salto Grande 1ª Queda (a)	Co	1,09±0,52	I
Cachoeira Salto Grande 1ª Queda (b)	Co	0,79±0,91	I
Cachoeira Salto Grande 2ª Queda (c)	Co	2,51±0,20	I
Cachoeira Salto Grande 2ª Queda (d)	Co	1,41±1,12	I
Sede administrativa (e)	Co	26,79±4,87	D
Sede administrativa (f)	Co	11,41±8,97	D
Sede administrativa (g)	Co	2,53±1,36	D
Sede administrativa (h)	Co	3,53±2,69	D
Sede administrativa (i)	Co	35,22±13,1	D
Sede administrativa (j)	Cr	2,69±1,50	D
Sede administrativa (k)	Cr	0,19±0,06	D
Base Itamambuca (l)	Cr	5,84±0,69	D
Base Itamambuca (m)	Cr	4,52±2,26	D
<i>Inverno</i>			
Cachoeira Salto Grande (a)	Cr	7,21±0,64	I
Cachoeira Salto Grande 1ª Queda (b)	Co	11,60±0,98	I
Cachoeira Salto Grande 2ª Queda (c)	Co	31,85±48,1	I
Cachoeira Salto Grande 2ª Queda (d)	Co	8,55±6,85	I
Sede Administrativa (e)	Co	43,90±36,1	D
Sede Administrativa (f)	Co	28,63±21,5	D
Sede Administrativa (g)	Cr	16,79±3,88	D
Sede Administrativa (h)	Cr	9,47±2,74	D
Base Itamambuca (i)	Cr	11,36±5,66	D
Base Itamambuca (j)	Cr	27,89±21,8	D
Cachoeira do Angelim (k)	Cr	6,30±1,60	I
Cachoeira do Angelim (l)	Cr	5,76±1,22	I

Letras entre parênteses indicam os diferentes pontos de coleta. Co = coloniais; Cr = crostosas; D = locais degradados; I = locais intactos.

Os valores da atividade da enzima nitrogenase foram muito variáveis dentro de cada amostra, o que gerou grandes valores de desvio padrão (Tab. 3). Todas as amostras tiveram

atividades quando comparadas com a amostra representada pelo controle, que variaram entre 0,19 a 35,22 para o verão e 5,74 a 43,90 mmol etil m⁻². dia⁻¹ para o inverno (Tab. 3).

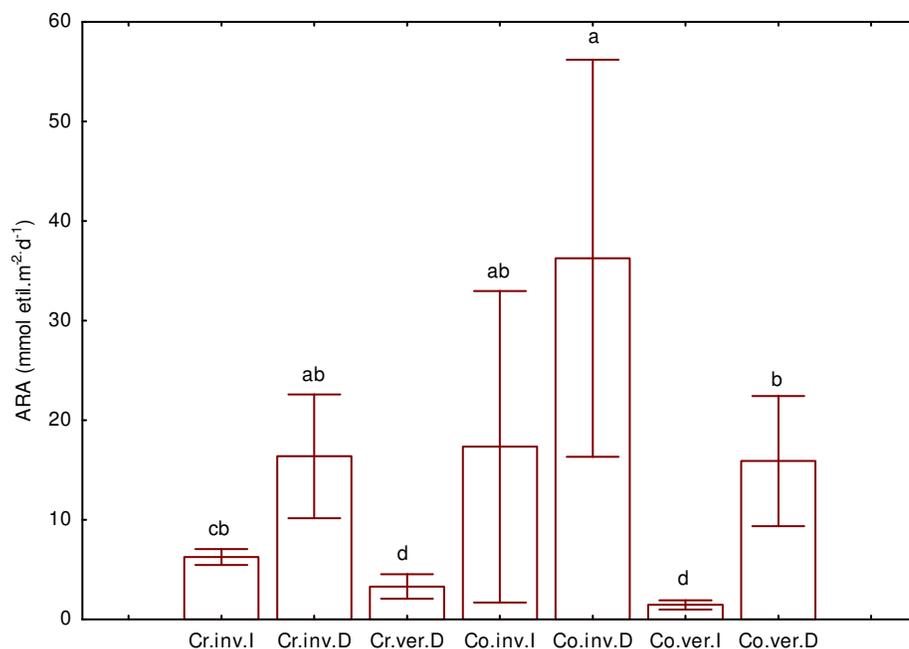


Figura 16. Variação entre os valores médios da atividade de redução de acetileno segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ANOVA ao nível de significância de 5%. Cr: cianobactérias crostosas; Co: cianobactérias coloniais; inv: inverno; v: verão; I: locais intactos; D: locais degradados. Letras iguais representam similaridade estatística, letras diferentes representam variação estatística segundo o teste Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A figura 16 mostra a variação dos valores de ARA entre as formas de vida e as estações. Ambas as formas de vida apresentam uma maior atividade da enzima nitrogenase para os locais degradados e para o inverno. Apesar de não diferir estatisticamente, Co apresentam valores de atividade mais elevados em comparação à Cr.

4.3.3 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio por técnicas de isotopia

Dez cepas isoladas de cianobactérias apresentaram crescimento no meio de cultura, mas somente quatro tiveram crescimento considerável e foram selecionadas para a experimentação de enriquecimento isotópico. As cepas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Nostoc*.

As cepas 3291 e 3292 são provenientes das amostras coletadas em locais intactos, nas redondezas da cachoeira do Ipiranga e sobre rocha na cachoeira Salto Grande, respectivamente. As cepas 3290 e 3305 foram coletadas em locais degradados, sobre concreto ao entorno da base Itamambuca e sobre solo com britas na sede da administração do parque, respectivamente.

Os resultados obtidos da experimentação isotópica e dos cálculos de conversão entre valores de ARA e N₂ fixado são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Atividade de FBN medido pela incorporação de ¹⁵N₂ em 4 cepas de *Nostoc* sp.

	N total (mg N g ms ⁻¹)	%Atom ¹⁵ N _{excess}	C ₂ H ₄ /N ₂
3290	1,159±0,112	0,00751±0,00039	4,38±1,06
3291	0,983±0,061	0,00903±0,00245	1,61±1,28
3292	1,039±0,027	0,00499±0,00079	1,00±0,03
3305	0,831±0,064	0,00738±0,00073	1,37±0,77

Nota: A abundância natural média de ¹⁵N das culturas controle foi 0,3658±0,0002.

4.3.4 Potencial de fixação biológica de nitrogênio pelas formas de vida nos locais de ocorrência

Com os valores da conversão C₂H₄/N₂ obtidos pelo experimento de enriquecimento isotópico, foi possível estabelecer um valor médio de 2,09. Extrapolando estes valores para os

resultados obtidos para o Núcleo Santa Virgínia, foi possível estimar o potencial de FBN para cada circunstância, mostrado na tabela 5.

Tabela 5. Potencial de FBN por cianobactérias de vida livre do Núcleo Santa Virgínia.

Formas de vida	g N m ⁻² a ⁻¹
Crosta de locais intactos	30,63
Crosta de locais degradados	48,12
Colônias de locais intactos	46,00
Colônias de locais degradados	127,53

Para a estimativa anual, foram utilizado valores para 6 meses de inverno e 6 meses de verão.

4.4 Discussão

A presença permanente de formas de vida livre de cianobactérias sobre superfícies expostas de rochas é bem descrita para ambientes temperados, mas pouco estudada em áreas tropicais (Büdel et al., 2002). A presença sobre as numerosas rochas nas margens dos rios, principalmente do Rio Pirapitinga, condiz com os relatos, já que são organismos resistentes a estes microambientes que sofrem variações extremas nos níveis de hidratação ao longo do dia e altas taxas de radiação solar (Büdel, 1999). Já em outras áreas de floresta, a presença destas formas de vida pode ser efêmera, podendo aparecer ou desaparecer dependendo do estágio sucessional local (Bowker, 2007).

As regiões degradadas do Núcleo Santa Virgínia são áreas do parque que tiveram sua vegetação extraída para dar espaço a estradas e construção da sede administrativa e bases de pesquisa do Núcleo Santa Virgínia. Para a manutenção destas áreas, são realizadas limpezas constantes como cortes e eliminação de toda a vegetação que se desenvolve nos arredores, o que favorece a maior abundância das formas de vida livre de cianobactérias. Estas áreas foram úteis para verificar o surgimento das formas de vida de cianobactérias, sendo as primeiras espécies a aparecerem, dando início a um processo de sucessão.

A área antropizada ao entorno da Base Itamambuca é de apenas poucos metros, mas permitiu acompanhar um rápido processo sucessional. A presença das cianobactérias em áreas degradadas tem importante papel na sucessão secundária, preparando o solo para as plantas que colonizarão na sequência (Bowker, 2007).

A grande variação nos valores da atividade da enzima nitrogenase entre as amostras também é relatada por outros autores (Aranibar et al., 2003; Fiore et al., 2005) e pode ser devido à variação no número de heterócitos nos tricomas os quais são diferentes dependendo da espécie e das condições do meio (Wolk et al., 1994).

Estudos mostram que o potencial de FBN pelas formas de vida livre de cianobactéria é dependente dos regimes de luz, precipitação, temperatura, hidratação e intensidade luminosa do passado e do presente (Zhao et al., 2010). A variação da atividade da enzima nitrogenase entre o verão e o inverno pode ser explicada principalmente pelas variações de temperatura e umidade (Belnap, 2002). Trabalhos em regiões temperadas apontam para maiores atividades da enzima no outono e primavera, estações que apresentam condições amenas de temperaturas e umidade já que, para estas regiões, o verão costuma ser seco e o inverno conta com temperaturas muito baixas, condições que afetam a atividade desta enzima (Stewart et al., 1967; DuBois & Kapustka, 1983). Já o clima regional do Núcleo Santa Virgínia é tropical temperado, sem estação seca (Setzer, 1966), com precipitação medial anual igual a 1.200 mm. Mesmo nos meses mais secos, junho a agosto, a precipitação média mensal nunca é inferior a 30 mm (Joly et al., 2008), o que pode favorecer a manutenção da atividade da enzima ao longo de todo ano.

Não há dados de nutrientes do substrato para as áreas coletadas, mas com a temperatura e a precipitação aumentada no verão, as taxas de decomposição de qualquer matéria orgânica dos solos pode ser aumentada, aumentando a disponibilidade local de compostos nitrogenados, e conseqüentemente, a diminuição da atividade da enzima nitrogenase (Vitousek et al., 2002).

Os solos da Mata Atlântica são pobres em nutrientes, e é a cobertura vegetal que garante um eficiente mecanismo de ciclagem de nutrientes (Joly et al., 2008; Vitousek & Sanford, 1986). As cianobactérias dos locais degradados tiveram os maiores valores de atividade da enzima nitrogenase, que pode refletir uma possível pobreza mineral dos solos expostos e sem cobertura vegetal. Essas condições favoreceriam a expressão dos genes para formação de heterócitos e FBN das cianobactérias (Adams & Duggan, 1999).

Foi possível notar, para as áreas degradadas, uma área central totalmente sem vegetação sendo colonizadas por cianobactérias coloniais e no entorno, a existência de uma faixa colonizada por cianobactérias crostosas. Além desta, existe uma faixa ocupada por vegetação herbácea e depois por uma vegetação mais desenvolvida. Segundo Belnap (2002), inicialmente pode haver o estabelecimento de colônias de *Nostoc* sp., que fixam quantidades substanciais de N₂. As Cr aparecem após a estabilização deste solo. A mudança na taxa de FBN é esperada com as mudanças na composição das espécies. Trabalhos demonstraram que o potencial de FBN varia com o estágio sucessional dessas formas de vida (Belnap, 2006; Housman et al., 2006), assim como a biomassa de fixadores de N₂ muda ao longo do processo sucessional (Belnap, 2002). Cianobactérias Cr fixariam menos por serem um agregado de vários organismos, tendo uma menor biomassa de cianobactérias em relação à Co.

As cepas 3291, 3292 e 3305 apresentaram menores valores de conversão em comparação com a cepa 3290. Isto significa que a incorporação de ¹⁵N foi maior em relação à produção de etileno. Liengen (1999) encontrou valores de conversão ainda mais baixos para colônias de *Nostoc commune* de ambientes árticos, que variaram entre 0,11 e 0,48. O valor de conversão de 4,38±1,06 encontrado para a cepa 3290 está próximo do valor teórico proposto e está de acordo com os valores descritos para outros trabalhos de enriquecimento para culturas de outras cianobactérias (Hardy et al., 1973; Montoya et al., 1996, Liengen, 1999) ou de sistemas simbióticos que têm as cianobactérias como organismo fixador de N₂ (DeLucca et al., 2002). Muitos trabalhos utilizam o valor teórico de conversão de 4:1 que é baseado no número de elétrons envolvidos na reação. São necessários quatro vezes mais elétrons para reduzir um

mol de N₂ que para reduzir um mol de acetileno. Mas foram encontrados poucos trabalhos que obtiveram valores de conversão por meio de enriquecimento isotópico com ¹⁵N₂ (Hardy et al., 1973; Montoya et al., 1996, Liengen, 1999, DeLucca et al., 2002).

Liengen (1999) sugeriu que baixos valores de conversão podem ser resultantes de subestimação da produção de etileno, pois algumas cianobactérias possuem a enzima nitrogenase formada por vanádio que é menos eficiente para a redução de acetileno em comparação com a nitrogenase que tem o molibdênio como componente. Alguns organismos podem portar genes para desenvolver os dois tipos de nitrogenase, mas expressar um ou outro dependendo das condições ambientais (Miller & Eady, 1988). Outro fator que subestimaria a atividade de redução de acetileno seria a presença de camada mucilaginosa composta de polissacarídeos, que envolvem as colônias e que é típica do gênero *Nostoc*. Essa camada provavelmente apresenta um coeficiente diferenciado de difusão entre N₂ e C₂H₂ (Stewart, 1980). A presença desta camada mucilaginosa pode diminuir os valores de conversão, pois diminui a passagem do gás acetileno em relação ao N₂.

As cepas não foram identificadas no nível específico ou caracterizadas quanto ao tipo de nitrogenase ou quanto à presença de mucilagem. Entretanto, foi possível observar maior presença de mucilagem nos três meios de cultura que tiveram os menores valores de conversão (3291, 3292 e 3305) em relação à cepa 3290 (anexo 5). Nesta situação, as cepas apresentariam o valor de conversão próximo ao valor teórico proposto. Caso contrário, esta variação de valor entre as cepas podem estar relacionadas com a capacidade intrínseca de cada espécie em fixar N₂.

É difícil fazer comparações de estimativa de FBN com outros trabalhos, pois estes reportam valores em diferentes unidades de medida, por hora ou por ano, e em diferentes escalas que vão de cm⁻² a ha⁻², além de a maioria ter sido feitos em ambientes áridos.

Para os trabalhos que estimam a FBN, os que relataram os maiores valores, mostram que a FBN pode chegar a mais de 13 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ para regiões semiáridas (Zhao et al.,

2010), 16,5 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ em floresta temperada (Antoine, 2004), e 13,2 g N m⁻² ano⁻¹ em áreas desérticas (Su et al., 2011). Os valores estimados neste trabalho para a Floresta Atlântica são maiores que os encontrados nos trabalhos realizados em regiões áridas ou temperadas e se aproximam mais dos valores apontados por Su et al. (2011) em áreas de deserto. Possivelmente, são as condições de temperatura e umidade e as condições de preservação da Floresta Atlântica que favorecem as altas taxas de FBN.

4.5 Conclusão

As formas de vida livre de cianobactérias se apresentaram fixando N₂, principalmente em áreas perturbadas que tiveram a cobertura vegetal removida. O processo de FBN por estes organismos sofre influência das estações, apresentando maior atividade no inverno em relação ao verão. As estimativas mostraram que as cianobactérias coloniais presentes em locais degradados fixam grandes quantidades de N₂, contribuindo para a reestruturação do solo e vegetação destes locais.

5. Considerações finais

Os resultados apresentados nesta dissertação estimaram valores de FBN por sistemas simbióticos entre leguminosas e rizóbios em duas diferentes fisionomias de Floresta Atlântica localizada no Parque Estadual da Serra do Mar além de valores potenciais de FBN por cianobactérias de vida livre em áreas intactas e áreas antropizadas da fisionomia de Floresta Montana no Núcleo Santa Virgínia.

As duas fisionomias de floresta estudadas apresentaram diferentes valores de FBN por leguminosas contribuindo para a demonstração de que apesar de ser a mesma floresta, as fisionomias apresentam funcionamento diferente.

A sazonalidade exerceu influência na FBN tanto para o sistema simbiótico entre leguminosas e rizóbios quanto para as cianobactérias de vida livre. A taxa de FBN se mostrou maior no inverno. No verão, o efeito da precipitação e temperatura aumentadas podem potencializar os processos de decomposição e mineralização da matéria orgânica do solo, disponibilizando nitrogênio para os organismos e diminuindo a necessidade de FNB.

A FBN por leguminosas nas fisionomias de floresta estudadas é baixa e está de acordo com o que é relatado para outras florestas tropicais intactas. A FBN por cianobactérias em regiões de floresta intactas também é menor em comparação com áreas que tiveram a vegetação removida.

A espécie *Inga sessilis*, apesar de formar simbiose com nove das 10 estirpes de rizóbio testadas, não estabeleceu simbiose na presença de grandes concentrações de nitrogênio na solução nutritiva.

6. Referências

- Adams DG, Duggan PS. 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist*, 144: 3–33.
- Aerts R. 1997. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystem: a triangular relationship. *Oikos*, Viçosa, 79: 439-449.
- Alexander V, Billington M, Schell DM. 1978. Nitrogen fixation in arctic and alpine tundra. In: *Vegetation and Production Ecology of an Alaskan Arctic Tundra* (Ed. By L.L. Tiezen) pp. 539-558. Springer, New York.
- Alves LF, Vieira SA, Scaranello MA, Camargo PB, Santos, FAM, Joly, CA, Martinelli, LA. 2010. Forest structure and live aboveground biomass variation along an elevational gradient of tropical moist forest (Brazil). *Forest Ecology Management*, 260:679–691.
- Antoine ME. 2004. An ecophysiological approach to quantifying nitrogen fixation by *Lobaria oregana* an ecophysiological approach to quantifying nitrogen fixation. *The Bryologist*, 107(1): 82-87.
- Apaydin H, Sonmez FK, Yildirim YE. 2004. Spatial interpolation techniques for climate data in GAP region in Turkey. *Climate Research*, 28: 31-40.
- Aranibar JN, Anderson IC, Ringrose S, Macko SA. 2003. Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope studies. *Journal of Arid Environments*, 54: 345–358.
- Ayanaba A, Lawson TL. 1977. Diurnal changes in acetylene reduction in field-grown cowpeas and soybeans. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 125-129.
- Balandreau JP, Millier CR. 1974. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field diurnal variations of nitrogenase activity in the field. *Applied Microbiology*, 27:662-665.
- Barron AR, Purves DW, Hedin LO. 2011. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*, 165:511-520.
- Belnap J, Lange OL. 2001. *Biological soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Ecological Studies Series 150. Springer, Berlin Heidelberg. New York, pp 241–261.
- Belnap J. 2001. Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts. In: Belnap J, Lange OL (Eds.). *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Ecological Study, Vol. 150. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 241–261.
- Belnap J. 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biology and Fertility Soils*, 35: 128–135.
- Belnap J. 2006. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes*, 20: 3159-3178.
- Bergersen FJ. 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. *Australian Journal of Biology Science*, 23: 1015-1026.
- Bergman B, Matveyev A, Rasmussen U. 1996. Chemical signalling in cyanobacterial-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 1: 191–197.

- Bowker MA. 2007. Biological Soil Crust Rehabilitation in Theory and Practice: An Underexploited Opportunity. *Restoration Ecology*, 15: 13-23.
- Bruce T, Martinez IB, Maia Neto O, Vicente ACP, Kruger RH, Thompson FL. 2010. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. *Microbial Ecology* 60: 840-849.
- Büdel B, Weber HM, Porembski S, Barthlott W. 2002. Cyanobacteria of inselbergs in the Atlantic rainforest zone of eastern Brazil. *Phycologia*, 41(5):498-506.
- Burris RH. 1972. Nitrogen fixation-assay methods and techniques. In: *Methods in Enzymology XXIV, Part B*, pp 415-431. Ed. A San Pietro. New York and London.
- Burris RH. 2001. Nitrogen Fixation. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. p. 1-5.
- Camargos, LS. 2007. Alterações no metabolismo de composto nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Campos MCR, Tamashiro JY, Assis MAD, Joly CA. 2011. Florística e fitossociologia do componente arbóreo da transição Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas - Floresta Ombrófila Densa Submontana do Núcleo Picinguaba/PESM, Ubatuba, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 11: 301-312.
- Cantarella H. 2007. Nitrogênio. In: Novais RF, Alvarez VVH, Barros NF, Fontes RLF, Cantarutti RB, Neves JCL. *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, 375-470.
- Carran RA, Rumball PJ, Brock JL, Crush JR. 1982. Diurnal variation in acetylene reduction by white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 25: 295-299.
- Cassetari, AS. 2011. Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica. 94 p. Dissertação (Mestrado em Solo e nutrição de Plantas) Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarie J, Boivin C. 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*, Warsaw, 48(2) 359-365.
- DeLuca TH, Zackrisson O, Gundale MJ, Nilsson MC. 2008. Ecosystem feedbacks and nitrogen fixation in Boreal Forests. *Science*, 320:1181.
- D'Haese W, Mergaert P, Promé JC, Holsters M. 2000. Nod factor requirements for efficient stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Journal of Biological Chemistry*, 275:15676–15684.
- Dias E. 2010. Leguminosae na Floresta Ombrófila Densa do Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia, São Paulo, Brasil: taxonomia e similaridade entre diferentes cotas altitudinais. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 368 p.
- Döbereiner J, Campelo AB. 1977. Importance of legumes and their contribution to tropical agriculture. In: Hardy RWF, Gibson AH (Ed.). *A treatise of dinitrogen fixation*. Section IV: Agronomy and Ecology. New York: Wiley, 191-220.
- Dodds WK, Gudder DA, Mollenhauer D. 1995. The Ecology of Nostoc. *Journal of Phycology*, 31:2–18.

- Dojani S, Lakatos M, Rascherb U, Wanekc W, Lüttged U, Büdela B. 2007. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guianas. *Flora*, 202:521-529.
- DuBois JD, Kapustka LA. 1983. Biological nitrogen influx in an Ohio relict prairie. *American Journal of Botany*, 70:8-16.
- Eady RE. 1980. Methods for studying nitrogenase. In: Bergersen FJ (Ed.). *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester: John Wiley, p. 213-264.
- Ehleringer JR, Rundel PW. 1989. Stable isotopes: history, units, and instrumentation. In: Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA. (Eds.). *Stable isotopes in ecological research*. Ecological Studies 68. New York: Springer-Verlag. p. 1-15.
- Eldridge DJ. 2003. Biological soil crusts and water relations in Australian Deserts. In Belnap J, Lange OL (eds), *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Ecological Studies, 150: 315–325.
- Eskew DL, Ting IP. 1978. Nitrogen Fixation by Legumes and Blue-Green Algal-Lichen Crusts in a Colorado Desert Environment. *American Journal of Botany*, 65: 850-856.
- ESRI. 2004. ArcMap GIS Help. Environmental Systems Institute, Redlands, CA.
- Faria SM, de Lima HC. 1998. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. *Plant and Soil* 200: 185–192.
- Faria SM, Franco AA, Jesus RH, Menandro S, Baitello JB, Mucci ESF, Dobereiner J, Sprent JI. 1984. New nodulating legume trees from south-east Brazil. *New Phytologist*, 98: 317-328.
- Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist* 111: 607–619.
- Fiore MF, Neilan BA, Copp JN, Rodrigues JLM, Tsai SM, Lee H, Trevors JT. 2005. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon Floodplain. *Water Research*, 39: 5017–5026.
- Flores E, Herrero A. 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 8: 39-50.
- Fred EB, Waksman SA. 1928. *Laboratory manual of general microbiology*. New York; London: McGraw-Hill Book, 143 p.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, Karl DM, Michaels AF, Porter JH, Townsend AR, Vo CJ. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70: 153-226.
- Garten CT, Van Miegroet H. 1994. Relationships between soil nitrogen dynamics and natural ¹⁵N abundance in plant foliage from Great Smoky Mountain National Park. *Canadian Journal of Forest Research*, Ottawa, 24(8):1636-1645.
- Gehring C, Vlek PLG, Souza LAG, Denich M. 2005. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. *Agriculture Ecosystems and Environment* 111: 237–252.

- Gehring C. 2003. O papel da fixação biológica de nitrogênio em Floresta Secundária e Primária da Amazônia Central. Dissertação (Doutorado) Faculdade de Agronomia Rheinische Friedrich-Wilhelm, Universidade de Bonn.
- Giller KE. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CABI Publishing. New York.
- Gómez SPM, Lambais MR. 2011. Fixação assimiótica de nitrogênio e estrutura de comunidades de diazotróficos nos solos da Mata Atlântica. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia.
- Gonçalves NJN. 2011. Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- González-Ruiz T, Jaramillo VJ, Cabriales JJP, Flores A. 2008. Nodulation dynamics and nodule activity in leguminous tree species of a Mexican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology*, 24: 107-110.
- Grossman JM, Sheaffer C, Wise D, Graham PH. 2005. Characterization of slow-growing root nodule bacteria from *Inga oerstediana* in organic coffee agroecosystems in Chapas, Mexico. *Applied Soil Ecology*, 29: 236-251.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43:1185-1207.
- Hardy RWF. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 47-81.
- Haselkorn R, Buikema WJ. 1992. Nitrogen fixation by cyanobacteria. In: Stacey G, Burris RH, Evans HJ (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York, 166-190.
- Hedin LO, Brookshire ENJ, Menge DNL, Barron AR. 2009. The Nitrogen Paradox in Tropical Forest Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 40: 613-635.
- Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183: 411-425.
- Holzmann H, Haselwandter K. 1988. Contribution of nitrogen fixation to nitrogen nutrition in an alpine sedge community (*Caricetum curvulae*). *Oecologia*, 76: 298-302.
- Hoogland DR, Arnon DI. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, University of California Agricultural Experimental Station, 39 p.
- Houlton BZ, Wang Y; Vitousek PM, Field C. 2008. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, 454: 327-330.
- Housman DC, Powers HH, Collins AD, Belnap J. 2006. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments*, 66: 620-634.
- Ingestad T. 1980. Growth, nutrition, and nitrogen fixation in gray alder at varied rate of nitrogen addition. *Physiologia Plantarum*, 50:353-364.
- Instituto Florestal. 2006. http://www.iflorestal.sp.gov.br/Plano_de_manejo/PE_SERRA_MAR/index.asp. Acesso em: 8 fev. 2012.

- Jacot K. 2000. Symbiotic N₂ fixation of various legume species along an altitudinal gradient in the Swiss Alps. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9):1043-1052.
- Johnson DA, Rumbaugh MD. 1986. Field nodulation and acetylene reduction activity of high-altitude legumes in the Western United States. *Arctic and Alpine Research*, 18(2): 171-179.
- Joly CA, Assis MA, Bernacci LC, Tamashiro JY, Campos MCR, Gomes JAMA, Lacerda MS, Santos FAM, Pedroni F, Pereira LS, Padgurschi MCG, Prata BME, Ramos E, Torres RB, Rochelle A, Martins FR, Alves LF, Vieira AS, Martinelli LA, Camargo PB, Aidar MPM, Eisenlohr PV, Simões E, Villani JP, Belinello R. 2012. Florística e fitossociologia em parcelas permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. *Biota Neotropica* 12(1): 1-23.
- Joly CA, Martinelli LA. 2008. Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa nos Núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. III Relatório Anual da FAPESP (Programa BIOTA/FAPESP, Processo, no 03/12595-7).
- Justino GC. 2009. Fixação de nitrogênio em plantas de soja com o sistema radicular alagado. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas.
- Kessler W, Boller BC, Nösberger J. 1990. Distinct influence of root and shoot temperature on nitrogen fixation by white clover. *Annals of Botany*, 65: 341-346.
- Kreibich H, Kern J, Camargo PB, Moreira MZ, Victória RL, Werner D. 2006. Estimation of symbiotic N₂ fixation in an Amazon floodplain forest. *Oecologia*, 147: 359-68.
- Leiros MC, Trasar-Cepeda C, Seoane S, Gil-Sotres F. 1999. Dependence of mineralization of soil organic matter on temperature and moistures. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 327-335.
- Leitão-Filho HF. 1987. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e sub-tropicais do Brasil. *IPEF* 35:41-46.
- Liengen T. 1999. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free-living cyanobacteria from high arctic habitats. *Canadian Journal of Microbiology*, 45: 223-229.
- Ludden P W. 2001. Nitrogenase Complex. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group.
- Lum MR, Hirsch AM. 2003. Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorous in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 368-382.
- Magalhães FMM, Magalhães LMS, Oliveira LA, Döbereiner J. 1982. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus. *Acta Botânica*, 12:509-514.
- Martins SC. 2010. Caracterização dos solos e serrapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, Estado de São Paulo. 2010. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Meio Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 156 p.
- McKey D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: Sprent JL, McKey D. (Ed.). *Advances in legume systematics: Part 5 – The Nitrogen Factor*. Kew: Royal Botanic Gardens, 211-228.
- McNabb DH, Geist JM. 1979. Acetylene reduction assay of symbiotic N₂ fixation under field condition. *Ecology*, 60:1070-1072.

- McNeill A, Unkovich M. 2007. The Nitrogen Cycle in Terrestrial Ecosystems. In: Marschner P, Rengel Z (Ed.). Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. *Soil Biology*, 10(1): 37-64.
- Medeiros MCP de, Aidar MPM. 2011. Structural variation and content of aboveground living biomass in an area of Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. *Hoehnea*, 38: 413-428.
- Meeks JC. 1998. Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *BioScience*, 48: 266–276.
- Menge DNL, Hedin LO. 2009. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120,000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology* 90(2):190–201.
- Metzger JP. 2009. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Conservation*, 142: 1138–1140.
- Miller RW, Eady RR. 1988. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*: low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochemical Journal*, 256: 429-432.
- Montoya JP, Voss M, Kahler P, Capone DG. 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3): 986-993.
- Moreira FMS, Cruz L, Faria S, Marsh T, Martínez-Romero E, Pedrosa FO, Pitard RM. 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3):197-206.
- Moreira FMS, Franco AA. 1994. Rhizobia-host interactions in tropical ecosystems in Brazil. In: Sprent JI, McKey D (eds). *Advances in legume systematics. Part 5. The Nitrogen factor.* pp 63-74 Royal Botanic Gardens, Kew, GB.
- Mortier V, Holsters M, Goormachtig S. 2011. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment*, 35(2):1365-3040.
- Mueller, R. 2012. Utilizing Geographic Information Science Advancements For Bathymetric Mapping and Dredging Assessment of a Small Urban Lake in Southeastern Minnesota. Em www.gis.smumn.edu/GradProjects/MuellerR.pdf. acessado em 01/04/2012
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403:852-858.
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *American Society of Plant Physiologists. The Plant Cell*, 7:869-885.
- Nieder R; Benbi DK. 2008. Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment. Springer Netherlands, p. 137-159.
- Olsen FJ, Hamilton G, Elkins DM. 1975. Effect of nitrogen on nodulation and yield of soybean. *Experimental Agriculture*, 11:289–94.
- Olson JB, Steppe TF, Litaker RW, Paerl HW. 1998. N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology*, 36: 231–238.
- Padgurschii MCG, Pereira LS, Tamashiro JY, Joly CA. 2011. Composição e similaridade florística entre duas áreas de Floresta Atlântica Montana, São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(2):139-152.

- Pate JS, Dart PJ. 1961. Nodulation studies in legumes. The influence on inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant Soil*, 15:329–46.
- Pearson H, Vitousek PM. 2001. Stand dynamics, nitrogen accumulation, and symbiotic nitrogen fixation in regenerating stands of *Acacia koa*. *Ecological Applications*, 11(5):1381–1394.
- Pereira LS. 2011. Composição florística e estrutura de um trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pons TL, Perreijn K, van Kessel C, Werger JA. 2006. Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest: ^{15}N natural abundance measurements supported by experiment isotopic enrichment. *New Phytologist*. 173: 154-167.
- Rahmonov O. 1999: Processes of overgrowing in the Błędów Desert (Southern Poland). Wydział Nauk o Ziemi Uniwersytetu Śląskiego, 71 pp.
- Rahmonov O. 2001. The processes of soil and plant cover formation on the sand of Błędów Desert (in Polish). In Partyka, J. (ed.), 45 lat Ojcowskiego Parku Narodowego. 20 lat Zespołu Jurajskich Parków Krajobrazowych Województwa Małopolskiego. Badania Naukowe w Południowej części Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej.Ojców, p. 201–205.
- Reis VMR; Teixeira K. 2005. Fixação Biológica de Nitrogênio - Estado da Arte. In: Aquino AM e Linhares (Eds.), cap. 6: 151-180.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142, 1141–1153.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, Berks, 111:1-61.
- Rockstrom J. 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*, 461:472-475.
- Rodríguez-Echeverría S, Fajardo S, Ruiz-Díez B, Fernández-Pascual M. 2012. Differential effectiveness of novel and old legume-rhizobia mutualisms: implications for invasion by exotic legumes. *Oecologia*, 170(1):253-261.
- Roggy JC, Prevost MF, Garbaye J, Domenach AM. 1999. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using ^{15}N . *Journal of Tropical Ecology*, 15:1–22.
- Rosado BHP, Oliveira RS, Joly CA, Aidar MPM, Burgess SSO. 2012. Diversity in nighttime transpiration behavior of woody species of the Atlantic Rain Forest, Brazil. *Agricultural and Forest Meteorology* 158: 13-20.
- S.O.S Mata Atlântica. 2006. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica Período 2000-2005. Estado de São Paulo. SOS MA/INPE. Retirado de http://mapas.znc.com.br/sos_atlas_2006/downloads/ATLAS-QUANTI2005SP.pdf
- Sanchez M. 2001. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea num gradiente altitudinal da Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- San't Anna CL, Azevedo MTP, Branco LHZ, Fiori MF, Lorenzi AS, Kastovsky J, Komárek J. 2011. Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 34(1):51-62.

- Sant'Anna CL, Azevedo MTP, Branco LHZ, Komárek J. 2007. New aerophytic morphospecies of *Nostoc* (Cyanobacteria) from São Paulo State, Brazil. *Hoehnea*, 34(1): 95-101.
- Scheffer-basso SM, Voss M, Victor A, Jacques Á. 2001. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos leonard.. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 687-693.
- Schubert KR. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. *Annual Review Plant Physiology*, 37:539-574.
- Setzer J. 1966. Atlas climatológico do estado de São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai. CESP, São Paulo. 96p.
- Shaw VK, Brill WJ. 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*, 74:3249-3253.
- Shtina EA, Hollerbakh MM. 1976. Ecology of soil algae. Nauka, Moscow, 143 pp.
- Silva RC, Pereira JM, Araújo QR, Pires AJV, Del Rei AJ. 2007. Alterações nas propriedades químicas e físicas de um Chernossolo com diferentes coberturas vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, 31: 101-107.
- Sousa Neto E, Carmo JB, Keller M, Martins SC, Alves LF, Vieira SA, Piccolo MC, Camargo P, Couto HTZ, Joly CA. 2011. Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide, methane and carbon dioxide in a gradient of elevation in the coastal Brazilian Atlantic Forest. *Biogeosciences*, 8:733–742.
- Souza-Moreira FM, da Silva MF, de Faria SM. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the amazon region of Brazil. *New Phytologist*, 121: 563–570.
- Sprent JI. 1897. *The Ecology of the Nitrogen Cycle*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 151pp.
- Sprent JI. 2005. Nodulated legume trees. In: Werner D, Newton WE (eds) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry and the environment*. Springer, The Netherlands.
- Sprent JI. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174:11–25.
- Starks TL, Shubert LE, Trainor FR. 1981. Ecology of soil algae: a review. *Phycologia*, 20:65-80.
- Stewart WDP, GP Fitzgerald, RH Burris. 1967. In situ studies on nitrogen fixation using the acetylene reduction technique. *PNAS USA*, 58:2071–2078.
- Stewart WDP. 1980. Systems involving blue-green algae (cyanobacteria). In *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Edited by F.J. Bergersen. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 583-635.
- Su Y, Zhao, X, Li A, Li X, Huang G. 2011. Nitrogen fixation in biological soil crusts from the Tengger desert, northern China. *European Journal of Soil Biology*, 47(3):182-187.
- Swift M, Bignell D. 2001. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. International Centre for Research in Agroforestry, Southeast Asian Regional Research Programme, Indonesia. 40p.

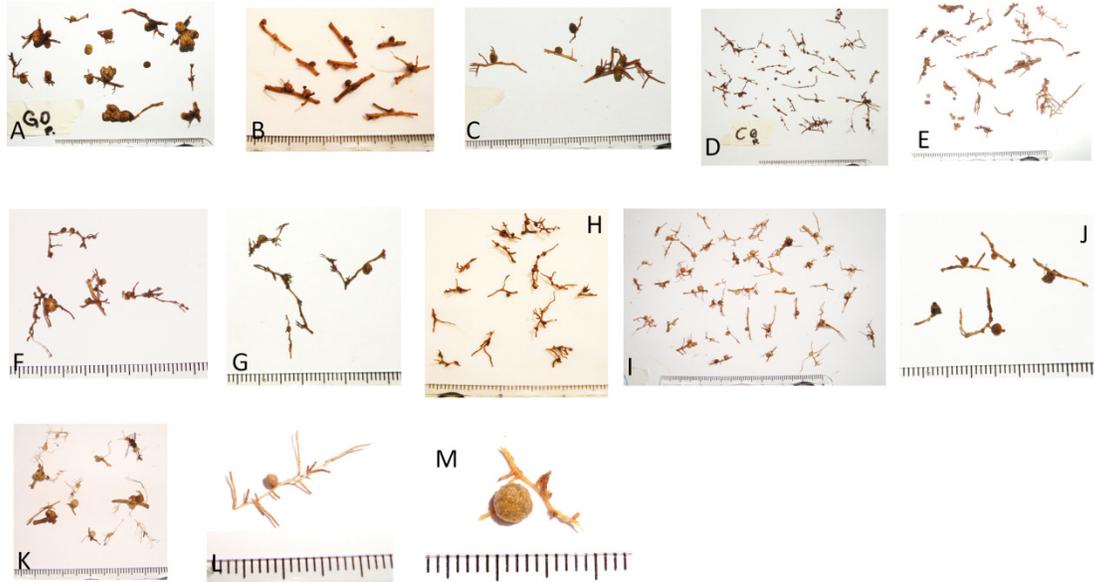
- Sylvester-Bradley R, Oliveira LA, Podesta Filho JA, John TVS. 1980. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. in representative soils of Central Amazonia. *Agro-Ecosystems* 6:249–266
- ter Steege H, Sabatier D, Castellanos H, van Andel T, Duivenvoorden J, Oliveira AA, Ek RC, Lilwah R, Maas P, Mori S. 2000. An analysis of the floristic composition and diversity of Amazonian forests including those of the Guiana Shield. *Journal of Tropical Ecology*, 16: 801–828.
- Tsai SM, Nodari RO, Moon DH, Camargo LEA, Vencovsky R, Gepts P. 1998. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 204(1):35–145.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR & Lima JCA. 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal*. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.
- Vessey, JK. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, 158(2): 151-162.
- Vieira SA, Alves LF, Duarte-Neto PJ, Martins SC, Veiga LG, Scaranello MA, Picollo MC, Camargo PB, Carmo JB, Neto ES, Santos FAM, Joly CA, Martinelli LA. 2011. Stocks of carbon and nitrogen and partitioning between above- and belowground pools in the Brazilian coastal Atlantic Forest elevation range. *Ecology and Evolution* 1: 421-34.
- Vieira SA, Alves LF, Aidar MPM, Araújo LS, Baker T, Batista JLF, Campos MC, Camargo PB, Chave J, Delitti WBC, Higuchi N, Honorio E, Joly CA, Keller M, Martinelli LA, Mattos EAD, Metzker T, Phillips O, Santos FAM, Shimabukuro MT, Silveira M, Trumbore SE. 2008. Estimation of biomass and carbon stocks: the case of the Atlantic Forest. *Biota Neotropica*, 8(2): 21–29.
- Vitousek PM, Sanford Jr RL. 1986. Nutrient cycling in moist tropical forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17:137–167.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman D. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7:737–750.
- Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB, Sprent JI. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57/58: 1–45.
- Vitousek PM, Field CB. 1999. Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: A simple model and its implications. *Biogeochemistry*, 46: 179-202.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3): 334-42.
- West NE. 1990. Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. *Advances in Ecological Research*, 20: 197–223.
- Whitton BA, Sinclair C. 1975. Ecology of blue-green algae. *Scientific Program, Oxford* 62:429-446.
- Wolk CP, Ernst A, Elhai J. 1994. Heterocyst metabolism and development. In: Bryant DE, ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 769–823.

- Xie Y, Chen T, Lei M, Yang J, Guo Q, Song B, & Zhou X. 2011. Spatial distribution of soil heavy metal pollution estimated by different interpolation methods: accuracy and uncertainty analysis. *Chemosphere*, 82(3): 468-76.
- Yair A. 2003. Effects of biological soil crusts on water redistribution in the Negev Desert, Israel: a case study in longitudinal dunes. In Belnap, J., Lange, O.L. (eds), *Biological soil crusts: structure, function, and management*. *Ecological Studies*, 150: 303–314
- Yamada A, Inoue T, Wiwatwitaya D, Ohuma M, Kudo T, Sugimoto A. 2006. Nitrogen Fixation by Termites in Tropical Forest, Thailand. *Ecosystems*, 9: 75-83.
- Zackrisson O, DeLuca TH, Nilsson MC, Sellstedt A, Berglund LM. 2004. Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology*, 85:3327–3334.
- Zhao Y, Xu M, Belnap J. 2010. Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China. *Journal of Arid Environments*, 74(10): 1186-1191.

7. Anexos

Anexo 1. Fotos dos Nódulos

Anexo 1a.



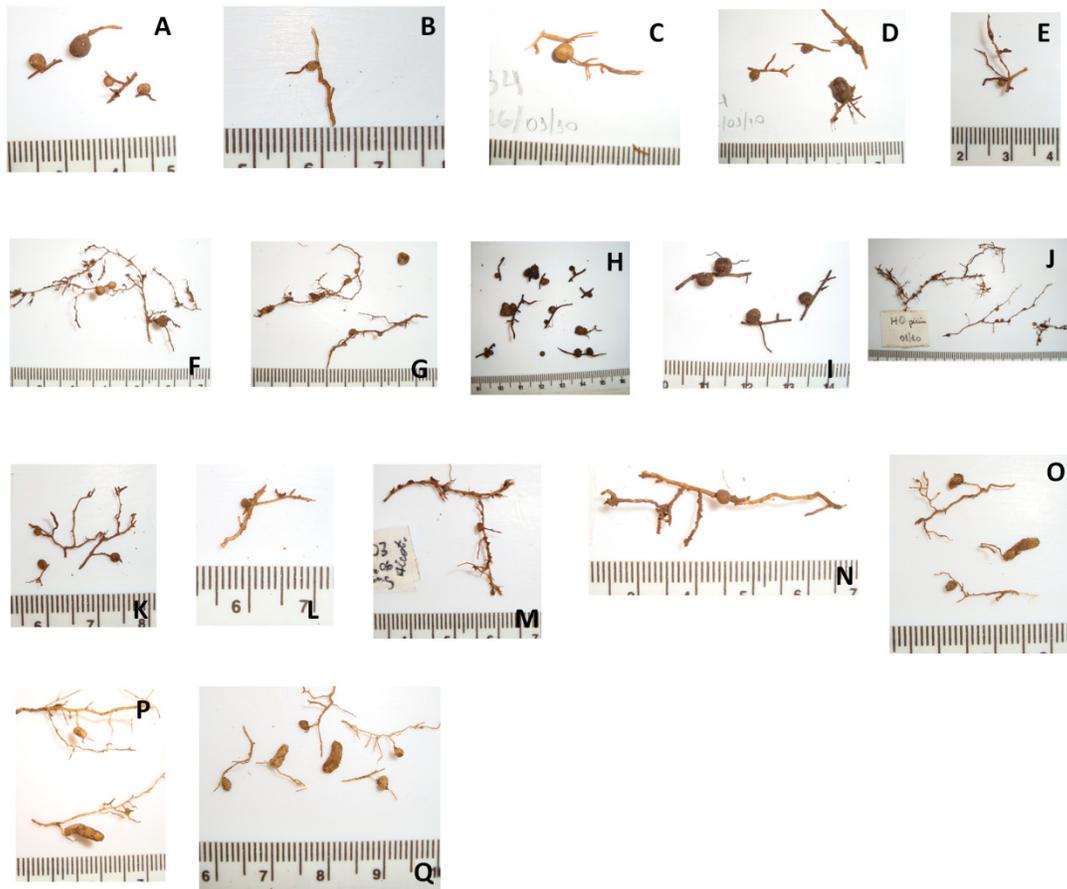
Nódulos encontrados no inverno. A: G0 (FTB); B: I7 (FTB); C: B2 (FTB); D: C0 (FTB); E: D4 (FTB); F: E1 (FTB); G: H0 (FTB); H: H6 (FTB); I: I7 (FTB); J: J0 (FTB); K: J6 (FTB); L: B4 (FM); M: C4 (FM). Letras e números correspondem à localização dos nódulos nas subparcelas coletadas. Sigla entre parênteses corresponde à parcela coletada (FTB: Parcela da Floresta de Terras Baixas; FM: Parcela da Floresta Montana).

Anexo 1b.



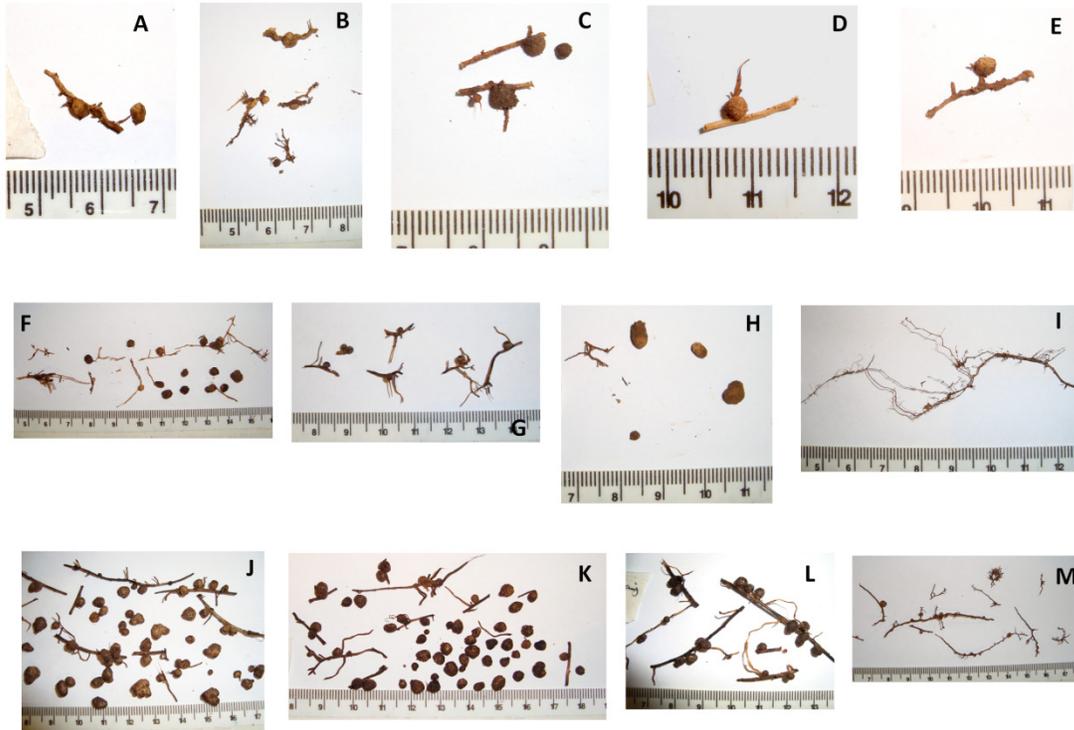
Nódulos encontrados na primavera. A: A8 (FTB); B: C8 (FM); C: C8 (FM); D: C8 (FM); E: B4 (FM); F: C0 (FTB); G: C4 (FM); H: F1 (FTB); I: D0 (FM); J: C8 (FM); K: C8 (FM); L: C8 (FM); M: F1 (FTB); N: G0 (FTB); O: G0 (FTB); P: G0 (FTB); Q: H0 (FTB); R: I2 (FTB); S: J0 (FTB); T: J0 (FTB); U: J0 (FTB); V: J4 (FTB); X: J0 (FTB); Z: F1 (FTB); W: C8 (FM). Letras e números correspondem à localização dos nódulos nas subparcelas coletadas. Sigla entre parênteses corresponde à parcela coletada (FTB: Parcela da Floresta de Terras Baixas; FM: Parcela da Floresta Montana).

Anexo 1c.



Nódulos encontrados no verão. A: C8 (FM); B: A3 (FTB); C: B4 (FM); D: C4 (FM); E: C8 (FM); F: F1 (FTB); G: F1 (FTB); H: G0 (FM); I: G6 (FTB); J: H0 (FTB); K: H6 (FTB); L: J0 (FTB); M: F1 (FTB); N: I7 (FTB); O: I7 (FTB); P: I7 (FTB); Q: I7 (FTB). Letras e números correspondem à localização dos nódulos nas subparcelas coletadas. Sigla entre parênteses corresponde à parcela coletada (FTB: Parcela da Floresta de Terras Baixas; FM: Parcela da Floresta Montana).

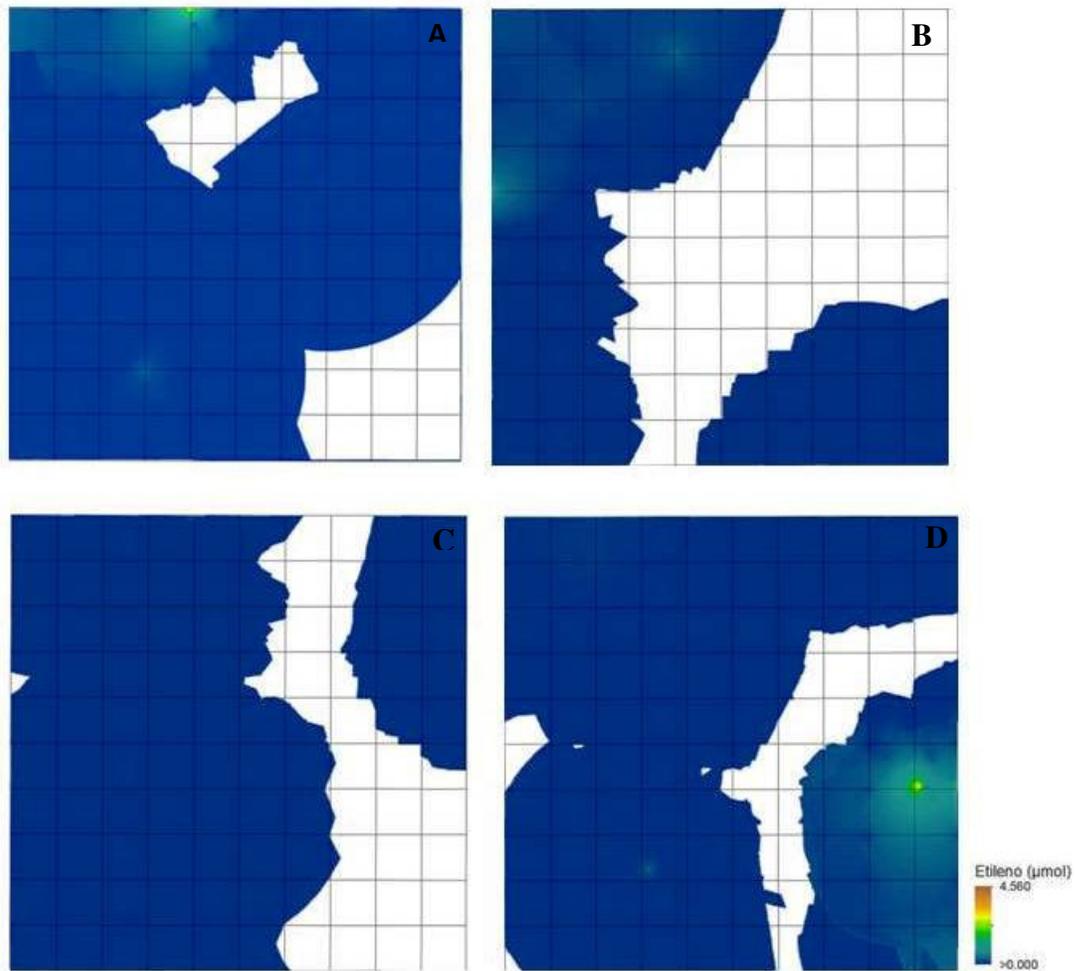
Anexo 1d.



Nódulos encontrados no outono. A: A2 (FTB); B: A8 (FTB); C: C8 (FM); D: C8 (FM); E: C8 (FM); F: B4 (FM); G: B8 (FTB); H: C4 (FM); I: D6 (FTB); J: E1 (FTB); K: G0 (FTB); L: F1 (FTB); M: E1 (FTB). Letras e números correspondem à localização dos nódulos nas subparcelas coletadas. Sigla entre parênteses corresponde à parcela coletada (FTB: Parcela da Floresta de Terras Baixas; FM: Parcela da Floresta Montana).

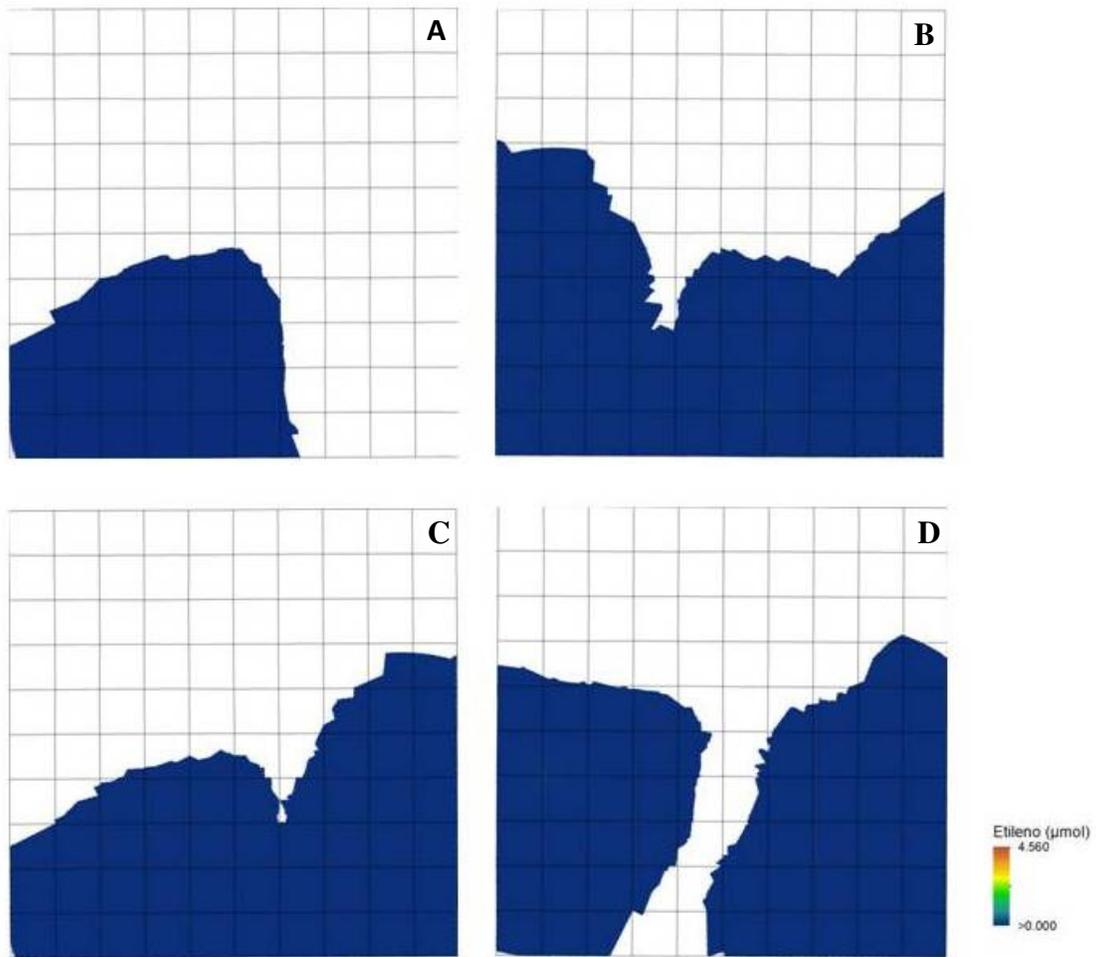
Anexo 2. Mapas de superfície

Anexo 2a.



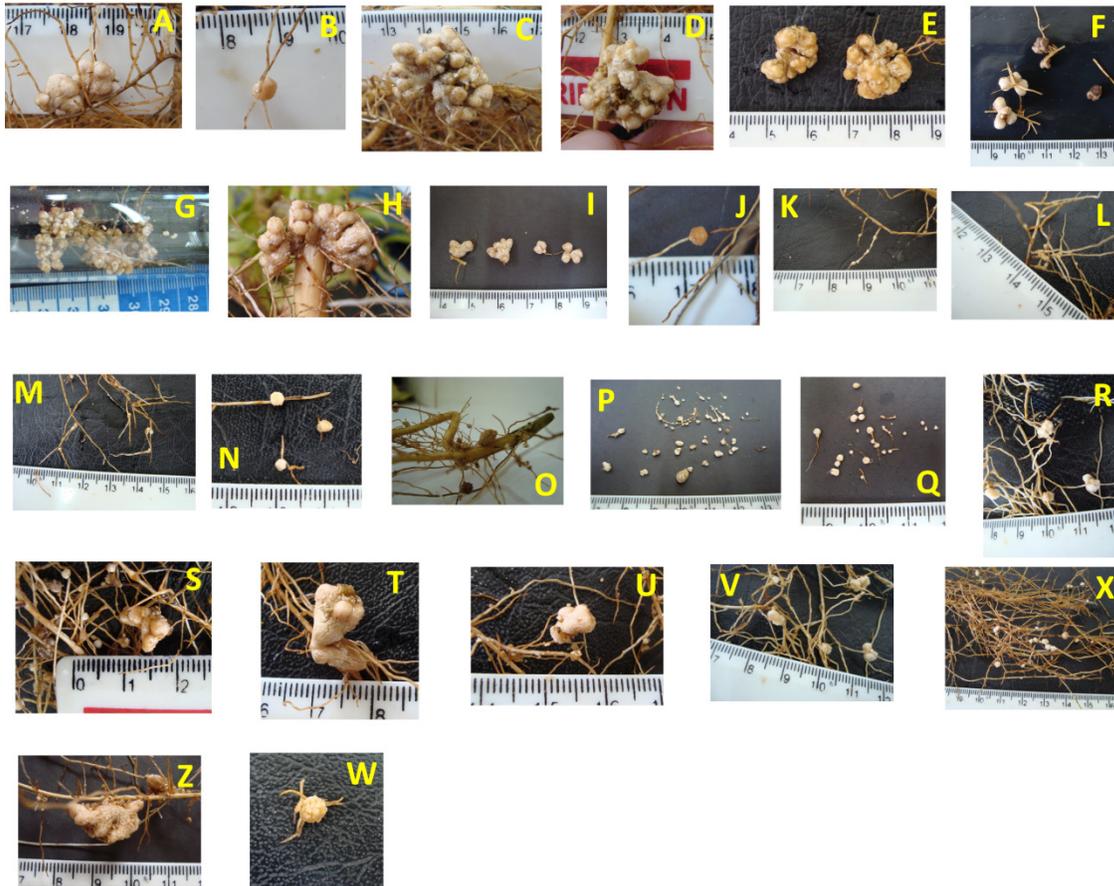
Superfícies demonstrando a interpolação dos valores da atividade da enzima nitrogenase na parcela da Floresta de Terras Baixas nas estações inverno (A), primavera (B), verão (C) e outono (D). Áreas brancas indicam ausência de atividade, áreas coloridas indicam atividade variável de acordo com a escala de cor.

Anexo 2b.



Superfícies demonstrando a interpolação dos valores da atividade da enzima nitrogenase na parcela da Floresta Montana nas estações inverno (A), primavera (B), verão (C) e outono (D). Áreas brancas indicam ausência de atividade, áreas coloridas indicam atividade variável de acordo com a escala de cor.

Anexo 3



Fotos de alguns nódulos formados pelas estirpes: A: *Bradyrhizobium* sp4 (2 mM de N); B: *Bradyrhizobium* sp4 (2 mM de N); C: *Bradyrhizobium* sp4 (2 mM de N); D: *Bradyrhizobium* sp4 (2 mM de N); E: *Bradyrhizobium* sp3 (2 mM de N); F: *Bradyrhizobium* sp3 (s/N); G: *Bradyrhizobium* sp2 (2 mM de N); H: *Bradyrhizobium* sp1 (2 mM de N); I: *Rhizobium tropici* (s/N); J: *Rhizobium tropici* (s/N); K: *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (s/N); L: *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (s/N); M: *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (s/N); N: *Rhizobium tropici*, type IIB (s/N); O: *Rhizobium tropici*, type IIB (s/N); P: *Rhizobium tropici*, type IIB (s/N); Q: *Rhizobium tropici*, type IIB (s/N); R: *Bradyrhizobium japonicum* (s/N); S: *Bradyrhizobium elkani* (s/N); T: *Bradyrhizobium elkani* (s/N); U: *Bradyrhizobium elkani* (s/N); V: *Bradyrhizobium elkani* (s/N); X: *Rhizobium tropici*, type IIB (s/N); Z: *Bradyrhizobium* sp1 (s/N); W: *Bradyrhizobium* sp4 (s/N). Valores entre parênteses representam a quantidade de N na solução nutritiva aplicada em cada tratamento (s/n: solução nutritiva não contendo N; 2 mM de N: solução nutritiva contendo 2 mM de N).

Anexo 4.

Meio BG-11 (Ripka 1979) sem NaNO_3 (BG₀)

Nutrientes – Solução-estoque	Quantidade (g/L)
EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	0,1
Citrato férrico amoniacal ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{Fe}^{3+} \cdot y\text{NH}_3$)	0,6
Solução metais traços*	-
Fosfato ácido dipotássio trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	4,0
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7,5
Cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,6
Carbonato de sódio (Na_2CO_3)	2
Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,6

*Solução de metais traço	Quantidade (g/L)
H_3BO_3	2,8600
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2220
Na_2MoO_4	0,3900
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0790
$\text{Co}(\text{NO}_3\text{O})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494

As soluções estoques são mantidas congeladas.

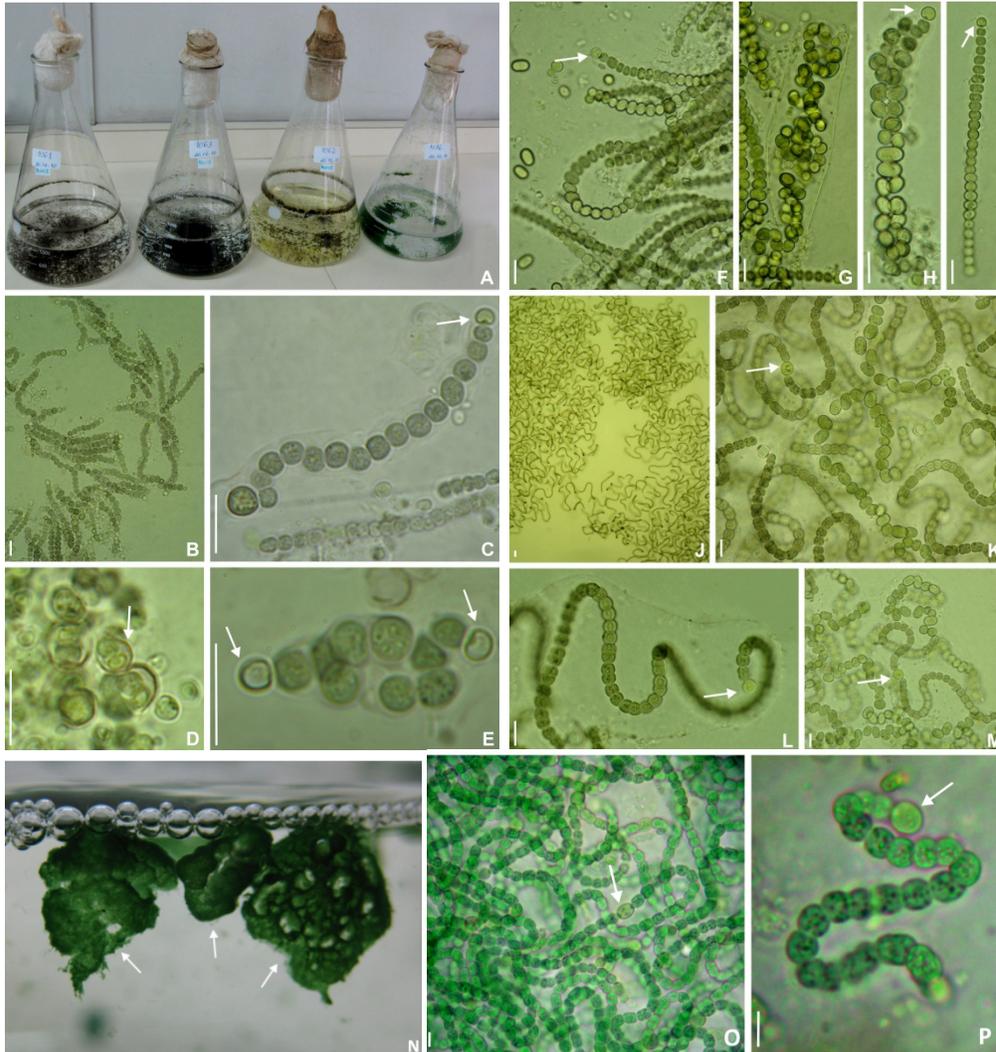
Para se preparar 1L de meio na concentração de 1:1, utiliza-se os seguintes volumes de cada solução estoque:

- 10 mL da solução de EDTA;
- 10 mL da solução de Citrato Férrico Amoniacal;
- 1 mL da solução de metais traços;
- 10 mL da solução de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$;
- 10 mL da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 10 mL da solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 10 mL da solução de Na_2CO_3 ;
- 10 mL da solução de Ácido cítrico.

Pipeta-se o volume de cada solução em um Erlenmeyer com capacidade para dois litros, para que se possa agitar. Após a adição das soluções o volume é completado até 1000 mL com água bideionizada e homogeneiza-se o meio. Feito isso o pH é ajustado para 7,4.

Para esterilização, o meio é autoclavado a 121°C por 30 minutos.

Anexo 5. Quatro cepas de *Nostoc* sp crescendo em meio de cultura sem N.



A: aspecto geral das cepas durante o cultivo – 3290, 3292, 3291 e 3305 (esquerda para direita)
 3290 (B-E): B: aspecto geral dos tricomas; C: detalhe do filamento mostrando bainha conspícua e heterócito (seta); D: germinação de acinetos em uma célula vegetativa e um heterócito (seta); E: colônia em estágio inicial mostrando heterócitos externos (setas).
 3291 (F-I): F: aspecto geral dos tricomas e tricoma com heterócito terminal (seta); G: arranjo emaranhado do tricoma dentro da bainha; H: tricoma com heterócito (seta); I: tricoma reto com heterócito terminal (seta).
 3292 (J-M): J: aspecto geral da organização dos tricomas; K: tricoma com heterócito (seta); L: arranjo do tricoma dentro da bainha e heterócito terminal (seta); M: tricoma com heterócito intercalar (seta).
 3305 (N-P): N: aspecto geral da colônia; O: aspecto geral dos tricomas e heterócito (seta); P: tricoma com heterócito terminal (seta).