

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias diazotróficas numa
Floresta de Restinga**

Silvia Eugenia Barrera Berdugo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2012**

Silvia Eugenia Barrera Berdugo
Bióloga

Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias diazotróficas numa Floresta de Restinga

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Barrera Berdugo, Silvia Eugenia

Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias diazotróficas numa Floresta de Restinga / Silvia Eugenia Barrera Berdugo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
95 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Cascas - Plantas 3. Ecologia microbiana
4. Filosfera 5. Mata Atlântica 6. Rizosfera I. Título

CDD 631.46
B271f

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*A mis padres Roque Barrera Celis y Eugenia
Berdugo de Barrera por su esfuerzo y apoyo
Incondicional. DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas bênçãos recebidas aqui, no Brasil, e por ser meu apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus Pais, por seus apoios à distância, desde o telefone, e pelos seus amores incondicionais.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, por me dar a oportunidade de trabalhar com ele, por sua orientação e confiança.

Ao Prof. Dr. Pablo Vidal-Torrado, por sua amizade, sua ajuda, pelas correções do português, pelas conversas e por todos os seus conselhos.

A Simone Vieira pelos dados das árvores e as coordenadas da Restinga.

Ao Prof. Plinio e o Laboratório de Ecologia de Isotopos (CENA) pelas análises de laboratório feitas.

A meus amigos e companheiros de casa, Gentil, Miho, Nancy, Wanderley e Wellington, pelos momentos compartilhados, bons e ruins, porque foi um ensino nesses dois anos.

Aos meus amigos do laboratório, Adriano, Alice, Ana Claudia, Eder, Elisa, Gisele, Giselle (Uai), Hector, Joze, Kelly, Lucas, Miho, Rafa, Rafael Valadares, Sandra, Vivian e Winston, por seus ensinamentos, por seus conselhos e os momentos vividos.

A Alice, Kelly e Rafael Valadares, **MUITO OBRIGADA** pelas correções do português, visto que sempre se ofereceram a fazê-las antes de eu pedir pra vocês.

Ao Adriano, **MUITO OBRIGADA**, por todos os ensinamentos, conselhos e a ajuda no desenvolvimento desta dissertação, especialmente nas análises dos dados do pirosequenciamento no MOTHUR e na escrita do trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Wladimir, Denise, Fernando, Luiz pela ajuda recebida.

A Marta, secretária do programa de solos e nutrição de plantas, pela ajuda.

A CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

Aos companheiros colombianos, peruanos e brasileiros, pelos almoços, jantares e festas em geral (latinas ou não); aos que estiveram em Piracicaba, mas agora estão em outros lugares.

Aos meus amigos Daniel, Javier, Maryeimy, Nancy e Sandra, por todos os momentos que compartilhamos juntos, pelas experiências vividas e pelos momentos inesquecíveis.

As pessoas que me acompanharam nas coletas Sandra, Mar, Julia, Emiliana, Miho, Rafael Valadares, Eder, Lucas, Josh e as estudantes de Lucas Carvalho.

Ao José da Unicamp pela ajuda no cromatografo.

A todas as pessoas que me acompanharam na distância, porque nunca faltaram palavra de apoio pra me manter sempre na luta.

MUITO OBRIGADA!!!

EPIGRAFE

“Lo importante en la vida es no darse por vencido, sino volver a empezar. Con Dios siempre hay un día para un nuevo comienzo. Él hace nuevas todas las cosas y nos invita a cambiar nuestra actitud.

Recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar y que ninguno es tan terrible para claudicar. No olvides que la causa de tu presente es tu pasado así como la causa de tu futuro será tu presente. Aprende de los audaces, de los fuertes, de quien no acepta situaciones, de quien vivirá a pesar de todo, piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo y tus problemas sin alimentarlos morirán. Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande que el más grande de los obstáculos. -Pablo Neruda

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1.1 Ciclo do Nitrogênio.....	19
2.1.2 Fixação Biológica de N.....	21
2.1.2.1 Complexo Nitrogenase.....	22
2.1.2.2 Organização dos Genes <i>nif</i> e <i>fix</i>	24
2.1.2.3 Regulação dos Genes <i>nif</i> e <i>fix</i>	25
2.1.2.4 Fatores Ambientais que Afetam a FBN.....	27
2.1.2.5 FBN Associada às Florestas.....	29
2.1.3 Diversidade de Diazotróficos em Ambientes Naturais.....	31
2.1.4 Restinga.....	32
2.2 Materiais e Métodos.....	34
2.2.1 Área de Estudo.....	34
2.2.2 Determinação da Atividade da Nitrogenase.....	37
2.2.3 Determinações da Razão Isotópica do N Estável e Determinação da Razão C/N.....	38
2.2.4 Análises Químicas do Solo.....	39
2.2.5 Análise Estatística.....	39
2.2.6 Desalojamento dos Microrganismos da Filosfera e Dermosfera.....	40
2.2.7 Extração de DNA Bacteriano do Solo.....	40
2.2.8 Amplificação do gene rRNA 16S por PCR para Pirosequenciamento.....	41
2.2.9 Análise de Sequências.....	42
2.3 Resultados e Discussão.....	42
2.3.1 Análises Químicas do Solo.....	42
2.3.2 FBN nos Compartimentos das espécies vegetais <i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>	44
2.3.2.1 Filosfera.....	45
2.3.2.2 Dermosfera.....	49
2.3.2.3 Solo.....	52
2.3.4 Variabilidade Espacial da FBN na Serapilheira e no Solo.....	57
2.3.5.1 Estimativa de Riqueza e Diversidade.....	60

2.3.5.2 Análise Taxonômica das Comunidades Bacterianas no Solo Rizosférico, Dermosfera e Filosfera de <i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>	64
2.3.5.3 Diversidade de possíveis Diazotróficos de Vida-Livre no Solo Rizosférico, Dermosfera e Filosfera de <i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>	69
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS.....	89

RESUMO

Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias diazotróficas numa Floresta de Restinga

Diazotróficos de vida-livre podem ser encontradas associadas à filosfera, dermosfera e rizosfera das espécies vegetais. Alguns dados sugerem que a fixação biológica de N₂ (FBN) por bactérias assimbióticas representa uma entrada importante de nitrogênio nos ecossistemas tropicais, variando com as espécies vegetais e nas diferentes partes da planta. O presente trabalho teve como objetivos estimar a quantidade de N₂ fixado de forma assimbiótica na filosfera, dermosfera e rizosfera sobre a copa das espécies vegetais *Guapira opposita* e *Euterpe edulis*, e avaliar a diversidade das bactérias assimbióticas, através da análise do gene rRNA 16S, em uma Restinga, em Ubatuba, SP. O estudo foi realizado no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, em épocas de baixa e alta pluviosidade. A atividade da nitrogenase foi determinada pela técnica de redução do acetileno e as concentrações de etileno foram determinadas por cromatografia gasosa. A diversidade de bactérias que habitam filosfera, dermosfera e solo foi acessada por pirosequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S. A maior fixação de N foi observada na dermosfera de *E. edulis* nas duas épocas de coleta ($175,1 \pm 53,4$ ng cm⁻² h⁻¹; $97,2 \pm 21$ ng cm⁻² h⁻¹), as taxas de fixação de N mais baixas foram observadas no solo. Na época de alta pluviosidade, a FBN na filosfera de *G. opposita* ($52,0 \pm 12$ ng cm⁻² h⁻¹) foi significativamente maior do que a filosfera de *E. edulis* ($3,6 \pm 06$ ng cm⁻² h⁻¹) e do que no mesmo compartimento mas em diferentes épocas de coleta ($7,5 \pm 1,3$ ng cm⁻² h⁻¹). O valor do $\delta^{15}\text{N}$ foi maior no solo onde a fixação de N foi mais baixa. Na filosfera e na dermosfera, a relação C/N foi mais baixa quando a FBN foi mais alta. A FBN no solo e serrapilheira de restinga apresentou grande variação espacial, com locais de alta atividade. As 188629 sequências obtidas foram agrupadas em 16727 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), distribuídos em 35 filos. Os principais filos detectados foram Proteobacteria (38%) e Acidobacteria (12%). As classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram as mais abundantes nos três compartimentos. Potenciais fixadores de N foram detectados nas classes Alpha Beta e Gammaproteobacteria. A abundância de cianobactérias fixadoras de N na filosfera e na dermosfera foi baixa, indicando que outros diazotróficos também colonizam esses ambientes e contribuem com a FBN.

Palavras-chaves: Bactérias fixadoras de nitrogênio; Dermosferas-Plantas; Ecologia Microbiana; Filosfera; Mata Atlântica; Rizosfera.

ABSTRACT

Biological N₂ fixation and diversity of diazotrophic bacteria in a Restinga Forest

Free-living N₂ fixing bacteria can be found associated with the phyllosphere, bark and rizosphere of the different plant species. Some data suggest that biological N₂ fixation (BNF) by free-living bacteria represents an important input of nitrogen in tropical ecosystem, varying with the plant species and in different parts of the plant. This study aimed to estimate the amount of N₂ fixed in the phyllosphere, bark and soil under the canopy of *Guapira opposita* and *Euterpe edullis*, and evaluate the diversity of bacteria through the sequencing of the 16S rRNA gene analysis, the phyllosphere, bark and soil in a Restinga area, Ubatuba, SP. The study was conducted in the Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba in seasons of low and high rainfall. Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay (ARA) and ethylene concentrations were determined by gas chromatography. The diversity of bacteria in the phyllosphere, bark and soil was accessed using pyrosequencing of the 16S rRNA V4 region. The bark of *Euterpe edullis* was higher at both sampling times (175,1±53,4 ng. cm⁻². h⁻¹, 97,2±21 ng. cm⁻². h⁻¹). The BNF rates were lower in soil. In high rainfall conditions, the BNF in the phyllosphere of *Guapira opposita* increased significantly (52,0±12 ng. cm⁻². h⁻¹) when compared with *Euterpe edullis* (3,6 ± 06 ng. cm⁻². h⁻¹) and *Guapira opposita* (7,5 ± 1,3 ng. cm⁻². h⁻¹) phyllosphere. The value of δ¹⁵N was higher in the soil where the rates of FBN was lower. In the phyllosphere and bark, C/N was lower when BNF was higher. BNF in soil great spatial variation with areas of high activity. The 18.629 sequences obtained were grouped into 16.727 Operational Taxonomic Units (OTUs) distributed in 35 phyla. The main phyla Proteobacteria represented 38% of the OTUs and Acidobacteria 12% of the UTOs. The classes Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria were the most abundant in the three compartments. Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria were the main potential N-fixers. The abundance of nitrogen-fixing Cyanobacteria in the phyllosphere and bark was low, indicating that others diazotrophics also colonize these environments and contribute with BNF.

Keywords: Nitrogen fixing bacteria; Bark – Plants; Microbial Ecology; Phyllosphere; Atlantic Forest; Rhizosphere.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N), apesar de ser abundante na atmosfera em sua forma gasosa (N_2), é um nutriente limitante ao crescimento vegetal nos ecossistemas terrestres (VITOUSEK; HOWARTH 1991). O maior aporte de N nos ecossistemas naturais é decorrente da atividade dos microrganismos diazotróficos, responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009). A FBN é influenciada pela temperatura, umidade (HICKS; HARMON; GRIFFTHIS, 2003) e disponibilidade de nutrientes (VITOUSEK; HOWARTH 1991), principalmente ferro (Fe) e molibidênio (Mo), constituintes da nitrogenase, e fósforo (P) importante na síntese de ATP (BARRON et al., 2008, REED et al., 2007).

Embora a FBN seja realizada principalmente pela simbiose de bactérias diazotróficas com espécies leguminosas (nodulação), bactérias diazotróficas assimbióticas, ou de vida-livre, também têm contribuição significativa no aporte de N nos ecossistemas terrestres (CLEVELAND, et al., 1999), especialmente nas florestas tropicais e temperadas (PEREZ et al., 2008; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2007). Grupos de procariotos filogeneticamente distintos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea são capazes de fixar N_2 . A abundância relativa das bactérias diazotróficas aeróbias, anaeróbias, anaeróbias facultativas, fototróficas, quimiotróficas e heterotróficas, pode variar dependendo do ambiente e de fatores ambientais como, por exemplo: luminosidade, temperatura e umidade e o tipo de substrato.

A FBN pode ser muito variável entre diferentes ecossistemas, ou dentro do mesmo ecossistema, apresentando grande variabilidade espacial (CLEVELAND, et al., 1999). Apesar da informação sobre as diferenças nas taxas de FBN comparando diferentes tipos de florestas, a contribuição e a diversidade das bactérias diazotróficas assimbióticas ainda é pouco estudada (REED et al., 2010).

A FBN assimbiótica ocorre em diferentes zonas dos ecossistemas florestais, tais como, no dossel (FREIBERG, 1998; GOOSEM; LAMB, 1986), na serrapilheira e no solo (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008), variando no espaço e no tempo, em função do próprio ambiente e da diversidade de diazotróficos encontrada em cada compartimento. A FBN que ocorre na superfície das folhas (filosfera) nas florestas tropicais pode ser uma importante entrada de N no sistema, sofrendo influência direta da espécie vegetal (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2007). Outro importante ambiente para FBN na parte aérea

das plantas é a Dermosfera das árvores (dermosfera) onde se encontram líquens e briófitas associadas às plantas e uma grande incidência de cianobactérias (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2007).

Um dos biomas brasileiros de maior importância e diversidade de espécies vegetais, animais e microbianas é a mata Atlântica. Este bioma que já se estendeu por toda a costa brasileira, hoje está restrito a pequenos fragmentos florestais. Dentro do bioma da Mata Atlântica, um importante ecossistema é a floresta de restinga. Esta área específica sofre grande influência flúvio-marinha, caracterizando-se pela vegetação na forma de mosaico, com a presença de plantas xerófitas de porte baixo com dossel não muito fechado e algumas árvores de grande porte com muitas epífitas associadas a elas (TALORA; MOLLERATO, 2000). Vários trabalhos descritivos incluem a vegetação das praias, das dunas e dos brejos próximos a rios ou lagoas como formações da restinga, mas devem ser destacadas as florestas das planícies costeiras, que, em muitos casos, formam gradientes com as Florestas Ombrófilas Densas de terras baixas, dificultando a distinção florística e estrutural entre estas unidades (JOLY; MARTINELLI, 2008). As condições peculiares do solo da restinga, como a baixa disponibilidade de nutrientes, alta salinidade e constante alagamento, contrastadas com a exuberante vegetação, tornam este ambiente muito interessante para o estudo da FBN como principal aporte de N e da diversidade de bactérias diazotróficas.

A diversidade microbiana nos diferentes ecossistemas pode ser estudada por técnicas dependentes de cultivo as quais limitam o estudo de uma pequena porção da diversidade bacteriana (<1%), ou por técnicas moleculares, as quais permitem o acesso a grupos não-cultiváveis pelos métodos tradicionais (KIRK et al., 2004). Técnicas moleculares baseadas no sequenciamento dos genes codificadores da subunidade ribossomal 16S (rRNA 16S) e em uma proteína do complexo nitrogenase (ex. *nifH*) têm sido utilizadas para o estudo da diversidade de microrganismos diazotróficos em vários ambientes, (ZHER et al., 2003, COELHO et al., 2009; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). A recente utilização de técnicas de sequenciamento em grande escala, como o pirosequenciamento, tem revolucionado os estudos de diversidade microbiana, permitindo a maior cobertura das populações e a detecção de grupos pouco abundantes (ROESCH et al., 2010).

A avaliação da FBN e a determinação da diversidade de bactérias diazotróficas nas florestas tropicais, especificamente na restinga, são relevantes para o entendimento conhecimento de como o N é disponibilizado para as plantas e reciclado no ecossistema. Estudos visando determinar a contribuição dos microrganismos diazotróficos assimióticos

em diferentes compartimentos da floresta (solo, dermosfera e filosfera) são de grande interesse e podem contribuir para o entendimento dos processos que regulam a sustentabilidade das florestas naturais.

O presente trabalho teve como objetivo estimar a quantidade de N fixado biologicamente e determinar a estrutura da comunidade de bactérias no solo rizosférico, dermosfera e filosfera de *Guapira opposita* (louro-branco) e *Euterpe edulis* (palmito jussara), em uma formação de restinga da Mata Atlântica, no município de Ubatuba, São Paulo. Adicionalmente foi determinada a variabilidade espacial da taxa de FBN no solo e serrapilheira em uma parcela permanente do núcleo Picinguaba do Parque Estadual Serra do Mar (PESM).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Ciclo do Nitrogênio

O Nitrogênio (N), apesar de ser o quarto elemento mais abundante na Terra, depois do Carbono (C), Hidrogênio (H) e Oxigênio (O), é geralmente um nutriente limitante para o crescimento vegetal (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009). Ele constitui 78% da atmosfera, na forma de dinitrogênio (N_2) indisponível para as plantas (SON, 2001). O N é indispensável em vários componentes celulares e processos bioquímicos que possibilitam a vida (por exemplo: aminoácidos e ácidos nucleicos) (FRANCIS; BEMAN; KUYPERS, 2007), constituindo aproximadamente 50% da biomassa vegetal (GLIESSMAN, 1998)

A redução do N_2 para amônia (NH_3) pela ação dos microrganismos diazotróficos é o primeiro passo para a disponibilização do N para as plantas, sendo denominada fixação biológica do N (FBN) (GLIESSMAN, 1998; FALKOWSKY, FENCHEL, DELONG, 2008). Em condições de aerobiose, a NH_3 é oxidada a nitrito (NO_2^-) pela ação das enzimas amônia monoxigenase e hidroxilamina oxidoreductase, que por sua vez é oxidado a nitrato (NO_3^-), através da enzima nitrito oxidoreductase, no processo conhecido como nitrificação (Figura 1) (PROSSER, 2007). A amônia também pode ser oxidada em condições anóxicas, utilizando o NO_2^- como aceptor de elétrons, resultando na produção de N_2 (Anammox). Ainda em condições anaeróbicas, o NO_3^- pode ser reduzido para N_2 , via NO_2^- , óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), no processo de desnitrificação (Figura 1) (PROSSER, 2007). As enzimas envolvidas nessas transformações são a nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, respectivamente. Porém, a disponibilidade de N mineral nos solos é baixa (GLIESSMAN, 1998). Por fim, o N-orgânico (por exemplo: aminoácidos, ácidos nucleicos) pode ser mineralizado para NH_3 pela ação de microrganismos decompositores, no processo de amonificação (Figura 1). Todas essas transformações do N no solo, além de serem importantes para a produtividade primária dos ecossistemas, dependem de grupos específicos de microrganismos (BERNHARD; 2010).

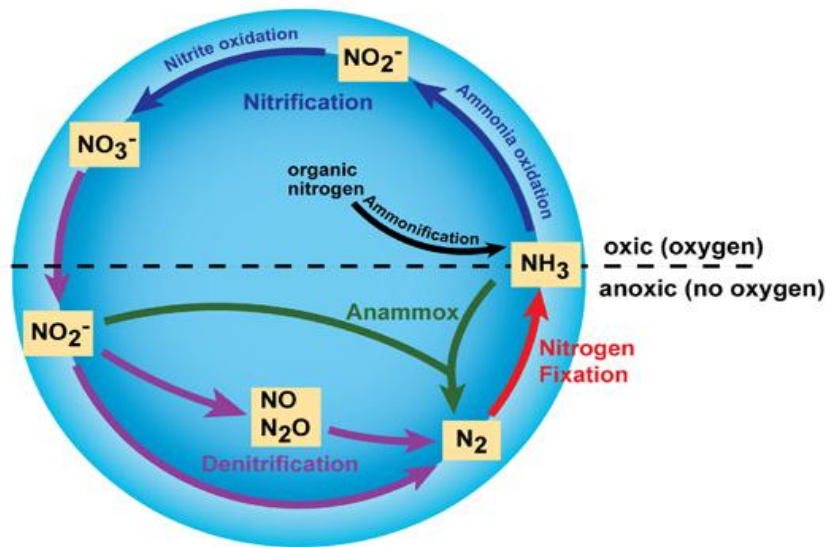


Figura 1 - Ciclo do Nitrogênio. Bernhard, 2010.

Os processos de transferência de N no ecossistema baseiam-se na produção e decomposição de resíduos (ciclagem de nutrientes). A decomposição de raízes e serapilheira são importantes no fluxo do N, influenciando nos estoques e na ciclagem desse elemento no solo (CHEN et al., 1999).

No sistema solo-planta, o N pode ingressar por deposições atmosféricas, fixação biológica, mineralização do N-orgânico (MARTINS, 2010) ou ainda a partir da fixação industrial (processo Harber-Bosch), principalmente na forma de fertilizante. O N fixado pelo processo Harber-Bosch é usado para criar vários produtos (plásticos, resinas ou explosivos), mas pouco se conhece sob quanto N é usado nesses processos industriais (GALLOWAY et al., 2008). Nos ecossistemas terrestres o principal aporte de N no solo é através da mineralização do N orgânico e da FBN (Tabela 1) (LINDO; WHITELEY, 2011).

As principais perdas de N nos ecossistemas naturais são decorrentes da volatilização do N_2 em condições de anaerobiose (desnitrificação e anammox) e lixiviação ou perdas subterrâneas do NO_3^- (MARTINS, 2010). Tais perdas podem atingir até 72% do total de N (PAUL; CLARK, 1996), limitando o crescimento vegetal (VITOUSEK; HOWARTH, 1991; TAN; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2003) e a produtividade em muitos ecossistemas naturais (BERNHARD; 2010).

É comum encontrarmos baixa disponibilidade de N nos solos brasileiros (CASSETARI, 2010), muito embora, nas florestas tropicais não se observam sintomas de deficiências nutricionais (MARTINS, 2010).

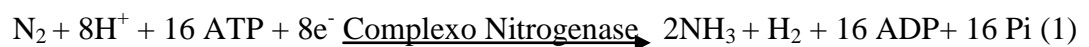
Tabela 1 - Fluxo global de N no solo. Entradas e perdas totais de N por cada processo.

Processos de adição	Tg N ano⁻¹	Processos de retirada	Tg N ano⁻¹
N-mineralização no solo	3000	Absorção pelas plantas	1200
Adições totais	320	Perdas Totais	312
Fixação Biológica	175	Desnitrificação	135
Fertilizantes	85	Volatilização	62
Deposição atmosférica	20	Lixiviação	90
Antropogênica	40	Erosão	25

Fonte: Paul e Clark (1996).

2.1.2 Fixação Biológica de N

A FBN é um processo enzimático onde o N₂ é reduzido a NH₃ pela ação de microrganismos de vida livre ou simbioses (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). Os microrganismos diazotróficos podem viver livremente no solo ou associados com plantas de maneira endofítica, ou em simbioses com leguminosas, protozoários, fungos, no trato intestinal de certos animais (DIXON; KHAN, 2004) e em ecossistemas aquáticos (ZHER et al., 2003). A FBN é representada pela seguinte equação:



A FBN é um processo que demanda muita energia (8 elétrons e 16 ATPs), devido à força da ligação tripla que confere estabilidade à molécula de N₂ (BERNHARD; 2010).

Em simbioses entre as bactérias diazotróficas e plantas (leguminosas), existe a formação de uma estrutura específica (nódulo) que protege a nitrogenase da ação do oxigênio, além do fornecimento contínuo de C, aumentando a eficiência da FBN e o fornecimento de NH₃ para a planta hospedeira (BÜRGMANN, 2003). Por outro lado, os diazotróficos de vida livre fixam o N₂ para produção da sua própria biomassa, que posteriormente será mineralizada, disponibilizando a NH₃ para as plantas (KENNEDY; TCHAN, 1992).

Embora as taxas de FBN assimiótica sejam menores do que as simbióticas (SON, 2001) a FBN assimiótica representa uma entrada importante de N em muitos ecossistemas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2007). Numa escala global, a FBN de vida-livre contribui com aproximadamente 30% do N fixado biologicamente (PEOPLES; CRASWELL, 1992).

Nos sistemas agrícolas, a simbiose entre rizóbios e leguminosas é considerada a fonte de entrada dominante de N (KENNEDY; ISLAM, 2001). Entretanto, em gramíneas, como a cana-de-açúcar, os diazotróficos assimióticos ou endofíticos podem contribuir com até 60% do N acumulado na biomassa (URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992). Em pastagens, a contribuição de N acumulado pela FBN por diazotróficos pode variar entre 10 a 42%, independentemente da intensidade de corte (SILVA et al., 2010).

O tipo de bactéria diazotrófica dominante em um ambiente está ligado diretamente à disponibilidade local de nutrientes, podendo haver o predomínio de organismos autotróficos em condições de baixa disponibilidade nutricional ou organismos heterotróficos em ecossistemas com acúmulo de matéria orgânica (BÜRGMANN, 2003, HOFMOCKEL; SCHLESINGER, 2007).

As bactérias diazotróficas, quando em simbiose ou outro tipo de relação menos especializada com diferentes espécies vegetais, podem oferecer outros benefícios além da FBN, como por exemplo, a produção de hormônios e promoção do crescimento vegetal (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

2.1.2.1 Complexo Nitrogenase

O complexo nitrogenase é responsável pela conversão do N_2 para NH_3 (HARDY et al., 1986), usando ATP na ausência de oxigênio (MASEPOHL; KRANZ, 2009). A nitrogenase é um complexo composto de duas unidades básicas de proteínas, a dinitrogenase redutase, um homodímero γ_2 e um heterotetrâmero $\alpha_2 \beta_2$ (RAYMOND et al., 2004.). Os genes *nif* codificam as proteínas do complexo nitrogenase e várias proteínas regulatórias em bactérias e arqueias (SARITA et al., 2008). A subunidade α , codificada pelo gene *nifD*, é uma ferro-proteína que coleta a força redutora e energia e contém o sítio ativo da redução do N_2 ; a subunidade β que é codificada pelo gene *nifK*, é uma proteína ferro-molibdênio e coleta e reduz o substrato (RAYMOND et al., 2004). A proteína Fe-Mo caracteriza-se por ter dois tipos de centros metálicos, um centro P [8Fe-7S] e o cofator Fe-Mo [homocitrato MoFe₇S₉] (SEEFELDT; DANCE; DEAN, 2004). A Fe-proteína apresenta um centro metálico [4Fe-4S] que funciona

como uma ponte entre as duas subunidades do dímero (DIXON; KAHN, 2004). Os genes *nifH* codificam o homodímero γ_2 , onde ocorre a hidrólise de ATP para a transferência de elétrons (ZEHR et al., 2003). A nitrogenase redutase (Fe-proteína, *nifH*) lança os elétrons para a dinitrogenase (proteína Fe-Mo, *nifD* e *nifK*) ocorrendo hidrólise de ATP. Além da dinitrogenase reduzir N_2 , também reduz substratos alternativos como H_2 e acetileno (C_2H_2) (BÜRGMANN, 2003).

Existem três tipos de nitrogenases: Mo-nitrogenase, V-nitrogenase e Fe-nitrogenase, todas elas necessitam de Fe e duas delas também de vanádio (V) e molibdênio (Mo), sendo mais comum a Fe-Mo nitrogenase (BELLENGER et al., 2011). As bactérias *Azotobacter* spp, um diazotrófico aeróbico do solo (MARTINEZ, 2006) e *Rhodospseudomonas palustris*, uma bactéria fotossintetizante (LARIMER et al., 2004), apresentam os três tipos de nitrogenase, o que é uma vantagem quando o Mo é limitante no solo (BELLENGER et al., 2011).

A FBN é um processo estritamente anaeróbico, em decorrência da sensibilidade do centro metálico [4Fe-4S] da Fe-proteína ao oxigênio (DIXON; KAHN, 2004). Paradoxalmente, a nitrogenase é altamente conservada em diferentes tipos de microrganismos aeróbios, forçando estes diazotróficos a desenvolverem mecanismos de proteção da enzima contra a ação tóxica do O_2 (BERMAN-FRANK et al., 2001). Entre estes mecanismos estão a formação de células especializadas, como os heterocistos nas cianobactérias (BERNHARD; 2010), produção da leghemoglobina no nódulo de leguminosas (BÜRGMANN, 2003), fixação de N noturna em organismos fotossintetizantes, entre outras. Além da sensibilidade ao O_2 , a atividade da enzima também se caracteriza pela supressão por alta disponibilidade de N no ambiente, dependência dos metais Fe, Mo e V, e disponibilidade de P e ATP (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011).

A atividade da nitrogenase pode ser avaliada indiretamente através da quantificação da atividade de redução do gás acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) (ARA) (HARDY et al., 1968; SON, 2001). Este processo consiste na incubação das amostras biológicas com o acetileno em um recipiente hermético e quantificação do etileno produzido através de cromatografia gasosa (VITOUSEK, 1994). A proporção em mols de etileno reduzido por N_2 fixado é de 3:1 (HARDY et al., 1968).

A técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}N$), baseada na diferença da abundância natural do isótopo ^{15}N entre o N do solo e o N atmosférico (SILVA et al., 2010), tem sido utilizada para estimar a FBN associada às plantas não leguminosas. A FBN pode ser estimada através dos valores de $\delta^{15}N$ fornecendo medidas integradas sobre a dinâmica de N ao longo do

tempo (BUSTAMANTE et al., 2004). Sabe-se que o valor do $\delta^{15}\text{N}$ do N_2 atmosférico é nulo, e razões de $\delta^{15}\text{N}$ próximas a zero estariam indicando maior fixação. Na Mata Atlântica, relatos de $\delta^{15}\text{N}$ em leguminosas localizadas em terras baixas variaram entre 0 e 2% em folhas (CAMPOS, 2009).

2.1.2.2 Organização dos Genes *nif* e *fix*

O processo de fixação de N_2 pode envolver até 20 genes (ZHER et al., 2003). Os principais genes envolvidos na fixação de N_2 são os genes *nif* e *fix*. Os genes *nif* são organizados em 7 ou 8 operons, sendo esses genes: *nifJ*, *H*, *D*, *K*, *T*, *Y*, *E*, *N*, *X*, *U*, *S*, *V*, *W*, *Z*, *M*, *F*, *L*, *A*, *B* e *Q*. Seis genes são requeridos para a síntese do cofator Fe-Mo da nitrogenase (*nifH*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifQ* e *nifV*) e dois têm como função mobilizar Fe e S para a nitrogenase (*nifU* e *nifS*) (Figura2) (MARTINEZ, 2006). Os genes *nifF* e *nifJ* codificam proteínas transportadoras específicas das nitrogenases. Os genes *nifH*, *nifD* e *nifK* estão envolvidos na síntese da nitrogenase e não são expressos constitutivamente, tornando o operon *nifHDK* um bom marcador molecular da fixação de N_2 (ZHER et al., 2003). O operon *nifHDK* foi encontrado em cepas de *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Em *Bradyrhizobium japonicum*, a organização é diferente e isolado de *nifDK* (LONG, 1989).

O produto do gene *nifA*, a proteína NifA, é o ativador da transcrição dos outros operons exceto o *nifL*, que codifica o repressor que inativa os genes *nif* (DIXON; KHAN, 2004). Em *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* já foram realizados estudos sobre a organização do operon *nif* (MARTINEZ, 2006).

Os genes *fix* estão envolvidos na FBN em espécies de rizóbios não tendo homólogos em *K. pneumoniae* (GUBLER E HENNECKE, 1986), e sim em alguns diazotróficos de vida livre como *Azotobacter* sp (KHAN et al., 1989). São genes adicionais que estão envolvidos na fixação de N_2 , sendo eles *L*, *J*, *A*, *B*, *C*, *X*, *G*, *H*, *I*, *S*, *K*, *N* e *V*. A função do operon *fixABCX* ainda não está completamente desvendada, podendo contribuir com a atividade da nitrogenase, com funções específicas da simbiose ou cascata de transferência de elétrons (LEE et al., 2000; GUBLER; HENNECKE, 1986). Os genes *fixL*, *fixJ* e *fixK* regulam a transcrição do gene *nifA* e dos outros genes *fix* em bactérias simbióticas (DIXON; KHAN, 2004). As quatro proteínas codificadas pelo operon *fixGHIS* provavelmente estariam ligadas à membrana, enquanto o gene *fixG* poderia codificar um complexo ferro-enxofre e o gene *fixI* uma ATPase transportadora de cátions (LONG, 1989).

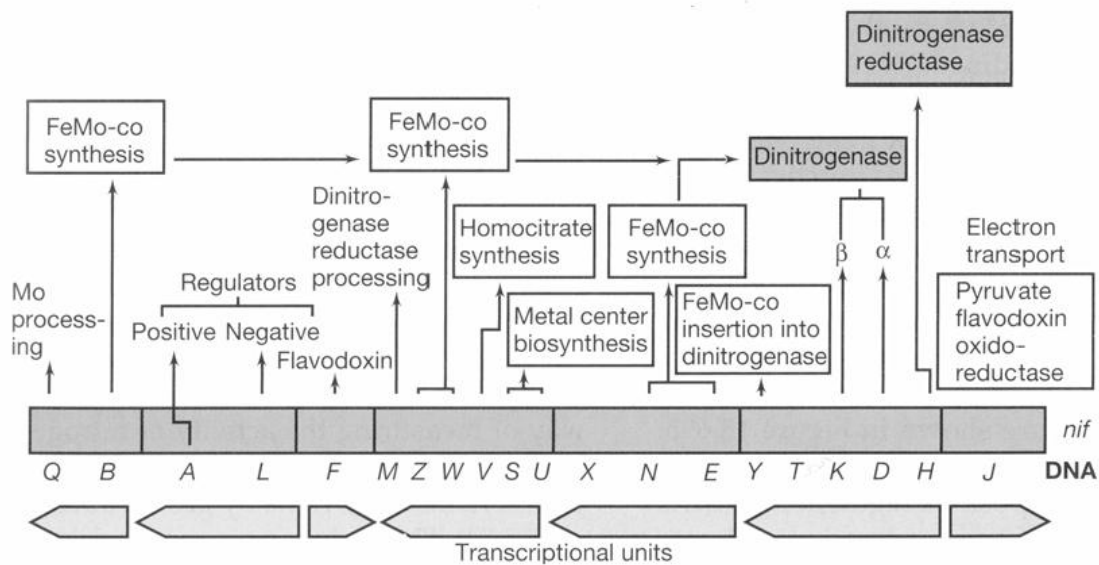


Figura 2 - Organização dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae*. As setas horizontais indicam a direção da transcrição. Reproduzido de Mardigan, 2000.

Embora a filogenia obtida a partir dos genes *nifH* é altamente consistente com a filogenia baseada no gene rRNA 16S (ZEHR, et al., 2003), e pode ser usada para caracterizar a diversidade de bactérias diazotróficas, a transferência lateral de genes *nifH* para alguns procariontes comprometem a sua consistência (MARTINEZ, 2006). A filogenia baseada no gene rRNA 16S mostra a ocorrência de fixadores de N entre famílias de procariontes mas, a filogenia obtida a partir das proteínas componentes da nitrogenase (*nifH* e *nifD*), indicam que os fixadores de N segregam-se de outra forma (RAYMOND et al., 2004).

2.1.2.3 Regulação dos Genes *nif* e *fix*

Os genes *nif* requerem ativação transcricional quando o N é limitante e as condições são favoráveis ao funcionamento da nitrogenase. Como foi mencionado antes, a regulação dos genes *nif* é mais detalhada em *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter capsulatus*, e *Rhodospirillum rubrum*, enquanto a regulação dos genes *fix* é mais detalhada em *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum*. Em relação à regulação em Actinobacteria e Firmicutes pouco se sabe, já as cianobactérias apresentam um mecanismo diferente daquele observado em proteobactérias (MARTINEZ, 2006). A transcrição dos genes *nif* é inativada por vários efetores, entre eles o oxigênio (MARTINEZ, 2006), uma variedade de compostos nitrogenados (KRANZ; HAZELKORN, 1986) e íons metálicos como Fe e Mo (BÜRGMANN, 2003).

Em Proteobacteria, os genes *nif* sofrem ativação transcricional pelo produto do gene *nifA* (proteína NifA) junto com o fator sigma da RNA polimerase. A co-dependência deles

para iniciar a transcrição dos promotores *nif* indica que a transcrição é um processo fortemente regulado (DIXON; KHAN, 2004). O *nifA* é o regulador chave da fixação de N e sua expressão depende da sua resposta ao oxigênio e ao N fixado. A atividade do gene *nifA* em vários diazotróficos do filo Proteobacteria é regulada em resposta à fonte de N e parece sensível ao oxigênio (DIXON; KHAN, 2004). Em *K. pneumoniae*, os produtos dos genes *NtrB–NtrC* são requeridos para ativação do gene *nifA*, sendo esse o primeiro passo da regulação (DIXON; KHAN, 2004). A atividade da proteína NifA é regulada pelo produto do gene *nifL* (proteína NifL), uma flavoproteína anti-ativadora, sensível ao N que inibe a transcrição (HALBLEIB; LUDDEN, 2000) (Figura 3).

Em diazotróficos simbióticos, como *S. meliloti*, a expressão do gene *nifA* ocorre em resposta aos produtos dos genes *fixL–fixJ*, de forma semelhante ao sistema *NtrBC* de *Klebsiella* (HALBLEIB; LUDDEN, 2000) (Figura 3). A transcrição do gene *nifA* e dos genes *fix* é controlada pelo sistema *fixL–fixJ* em resposta ao O₂ juntamente com *fixK*. No entanto, o gene *fixK* é que ativa a expressão do *nifA* (DIXON; KHAN, 2004) (Figura 3).

Também foi observada regulação pós-traducional dependente de ribosilação com ADP. Esse tipo de regulação foi identificado primeiramente em *R. rubrum*. A ribosilação por ADP ocorre num resíduo do aminoácido Arginina da Fe-proteína pela formação de uma ligação glicosídica entre a Arginina e uma ribosa terminal da ADP- Ribosa (LUDDEN; ROBERTS, 1989). Na nitrogenase, a presença do grupo ADP-Ribose evita a associação entre a Fe-proteína e a Fe-Mo proteína, bloqueando a transferência de elétrons, e a síntese de ATP (HALBLEIB; LUDDEN, 2000).

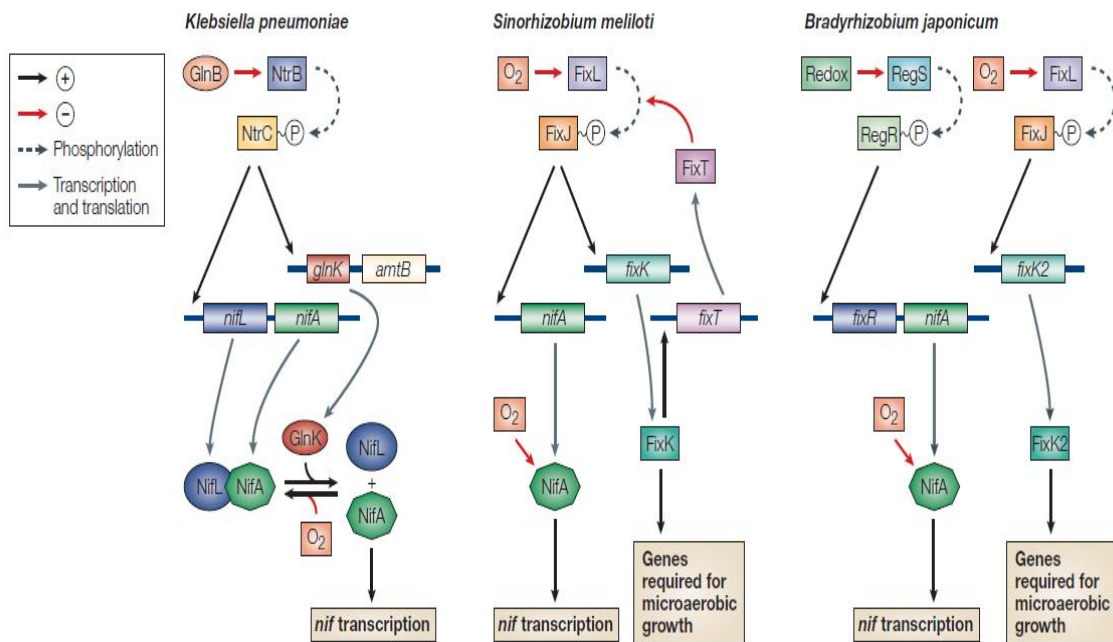


Figura 3 - Comparação das Dermosferatas regulatórias controlando a transcrição dos genes *nif* em *K. pneumoniae*, *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum* envolvendo os genes *fix*. Reproduzido de Nixon e Khan, 2004.

2.1.2.4 Fatores Ambientais que Afetam a FBN

Diversos fatores ambientais influenciam na FBN, porém, o grau de influência pode ser variável se levarmos em consideração os diferentes compartimentos (filosfera, dermosfera, serapilheira, solo, etc) na floresta. Alguns destes fatores ambientais são comuns a todos os compartimentos e funcionam como reguladores da FBN. A mudança na disponibilidade de nutrientes no substrato, por exemplo, pode alterar a composição da comunidade de microrganismos diazotróficos, favorecendo determinados grupos e regulando a fixação de N. No entanto, a maior parte dos mecanismos que regulam esse processo ainda é desconhecida (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011).

Foi observada uma correlação positiva entre a relação C:N e a fixação de N_2 no solo e na filosfera em duas floresta tropicais de Porto Rico (CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009). Tem sido observado também que o incremento na disponibilidade de N poderia inibir a FBN em florestas tropicais, sendo esta mais ativa em ecossistemas apresentando demanda ou saída de N relativamente altas (CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011).

O fósforo é o elemento mais limitante para a FBN, devido ao alto requerimento de ATP no processo de redução de N_2 . Reed, Cleveland e Towsend (2011) observaram que a

concentração de P influenciou significativamente na eficiência espécie-específica da FBN entre os compartimentos do perfil vertical, numa floresta na Costa Rica. O teor de Mo no solo também afeta significativamente a FBN assimbiótica heterotrófica em florestas tropicais (BARRON et al., 2008), uma vez que o Mo é essencial para o funcionamento do complexo nitrogenase.

A disponibilidade de água seria outro fator importante envolvido na regulação da fixação de N_2 , diminuindo drasticamente as taxas de FBN nos períodos de seca, quando comparadas com o período chuvoso (FREIBERG, 1998). Aumentos na umidade, especialmente em ambientes secos, afetariam positivamente a FBN (JACKSON et al., 2011). A grande disponibilidade de água, juntamente com outros fatores edáficos, também afeta a concentração de O_2 no solo. Ambiente alagados, em condições anoxicas, favorecem a atividade de diazotróficos anaeróbicos ou microaerófilos no solo, podendo aumentar a taxa de fixação de N (HICKS; HARMON; GRIFFTHIS, 2003, HOFMOCKEL; SCHLESINGER, 2007).

A temperatura também afeta positivamente a FBN, explicando maiores taxas de fixação em biomas tropicais (CLEVELAND, 1999). Entretanto, existe uma faixa de temperatura ótima para a FBN, a qual é esta reduzida significativamente em condições extremas (HICKS; HARMON; GRIFFTHIS, 2003). Temperaturas baixas somadas a pequenas precipitações contribuem para a pouca FBN em florestas de altas latitudes (CLEVELAND, 1999).

A abundância, composição da comunidade microbiana e atividade dos diazotróficos do solo são influenciadas por características abióticas como pH, disponibilidade de P (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009), quantidade de C, relação C:N (POLY et al., 2001), relação N:P, temperatura (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009), umidade (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011) e matéria orgânica (CHARYULU; RAJARAMAMOHAN, 1980).

Freiberg (1998) observou que a FBN na filosfera aumenta com a idade das folhas e a densidade dos organismos epifíticos na filosfera. A intensidade luminosa, estresse osmótico, exposição à radiação UV, umidade da folha e disponibilidade de nutrientes também afetam a FBN na filosfera (BENTLEY, 1987). A colonização da filosfera é dependente da exsudação de nutriente pela planta, injúrias no tecido foliar causadas por insetos, ou aporte de nutrientes pela água da chuva (YANG et al., 2001). A disponibilidade de fontes de C é um fator importante para a colonização da filosfera, podendo limitar ou selecionar as comunidades microbianas nesse compartimento (LINDOW; LEVEAU, 2002). A filosfera é um ambiente

considerado hostil para os microrganismos que se alojam ali. Porém, esses microrganismos podem formar biofilmes sobre a superfície das folhas, aumentando a sua capacidade de sobrevivência (ANDRADE, 2007).

A dermosfera também é um ambiente que está exposto a flutuações de temperatura, radiação ultravioleta, estresse osmótico, umidade, variações morfológicas e genotípicas das plantas de maneira semelhante à filosfera (ANDRADE, 2007). Os microrganismos que habitam a dermosfera podem advir do solo, plantas vizinhas ou de vetores como insetos (ANDRADE, 2007). Líquens e briófitas, presentes na Dermosfera, podem apresentar cianobactérias e organismos diazotróficos heterotróficos associadas a eles, ampliando a FBN neste compartimento (CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009). A textura verrugosa da Dermosfera de algumas espécies arbóreas poderia abrigar bactérias diazotróficas, favorecendo a FBN nessas espécies (UCHINO; HAMBALI; YATAZAWA, 1984). Em alguns trabalhos foi quantificada a FBN e a diversidade de diazotróficos em líquens ou briófitas, porém quando estavam associados com rochas ou madeira morta (BATES et al., 2010; CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009). Estimativas na dermosfera são inexistentes.

2.1.2.5 FBN Associada às Florestas

Em diferentes ecossistemas, os diazotróficos de vida-livre heterotróficos, cianobactérias e diazotróficos simbióticos são os principais microrganismos que contribuem com o N fixado. Em áreas de floresta ou áreas agrícolas que são dominadas por diazotróficos simbióticos, são observadas taxas de fixação de N muito altas, acima de $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, enquanto em diferentes ambientes, as taxas de FBN de vida livre variaram de 1 a $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (VITOUSEK et al., 2002). No entanto, em alguns biomas, a FBN de vida-livre poderia contribuir com maior entrada de N do que a FBN simbiótica (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008), e levando em consideração a área do bioma, a FBN de vida-livre poderia contribuir com uma proporção significativa do aporte de N numa escala global (CLEVELAND et al., 1999).

As maiores taxas de FBN são observadas em regiões tropicais do que em florestas tropicais o boreais (GALLOWAY et al., 2008) e pode ser observado na Tabela 2 segundo Reed, Cleveland e Townsend, (2011). Esse fato poderia ser explicado pela maior abundância de leguminosas arbóreas (VITOUSEK et al., 2002), juntamente com a alta taxa de decomposição da serapilheira, devido a maior umidade e temperatura, nas florestas tropicais quando comparadas com florestas temperadas ou boreais (VITOUSEK; HOWARTH, 1991).

No entanto, devido ao fato das taxas de FBN simbióticas serem determinadas em poucos diazotróficos e que diazotróficos simbióticos potenciais podem não fixar N_2 em ambientes naturais (BARRON et al., 2011), a abundância de leguminosas não pode ser um indicador de entrada de N por FBN simbiótica em florestas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008).

Taxas de FBN simbiótica e de vida livre variam dentro da floresta, em diferentes substratos (folhas, Dermosfera e solo) e entre florestas tropicais (Tabela 2), devido à influência de diferentes fatores ambientais (BARRON et al., 2008). Ao longo do perfil vertical de uma floresta na Costa Rica (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008), taxas mais baixas de FBN foram observadas na filosfera ($0,21 \text{ ng g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), enquanto na serapilheira encontraram-se as taxas mais altas ($52,04 \text{ ng g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Já em duas florestas em Porto Rico, foi no solo (entre $20,2$ e $61,8 \text{ } \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) que observou-se maior FBN (CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009). Mas esse padrão não se repete em todos os ecossistemas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). Numa floresta, no Havaí, observou-se que na filosfera, a FBN foi mais alta do que na serapilheira e no solo (BENNER et al., 2007). Variações nas taxas de FBN em um único compartimento, entre diferentes espécies vegetais também podem ser observadas, sugerindo que características específicas das plantas influenciam na FBN. (PÉREZ; CARMONA; ARMESTO, 2010; CUSACK; SILVER; McDOWELL, 2009; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008) Alguns autores consideram que a fixação de N_2 que ocorre na filosfera é o mecanismo principal para disponibilizar esse nutriente nos ecossistemas tropicais úmidos (FREIBERG, 1998; YANG et al., 2000; FURNKRANZ et al., 2008).

Verificou-se que em áreas de pastagem com gramíneas e cana-de-açúcar têm-se mantido níveis razoáveis de produtividade sem aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que indica que este fenômeno poderia estar relacionado com o aporte de N via FBN por microrganismos endofíticos (MOREIRA et al., 2010). No entanto na simbiose entre *B. japonicum* e a soja, 70% do N fixado pela bactéria é assimilado pela planta (BALDANI et al., 1997).

Tabela 2 - Taxas de FBN de vida-livre e simbiótica estimada em diferentes biomas.

Bioma	FBN de vida-livre	FBN simbióticas
	Kg N há⁻¹ ano⁻¹	Kg N há⁻¹ ano⁻¹
Tundra úmida e alpina	0,4-3,0	1,0-4,9
Floresta boreal	0,3-3,8	0,3-6,6
Floresta temperada	0,01-12	1-160
Pastagens temperadas	0,1-2,1	0,1-10
Savana tropical	3-30	3-90
Várzea tropical	4,1-12	14-28,5
Floresta decídua tropical	3,3	7,5-30
Floresta verde tropical	0,1-60	5,5-16
Deserto	0,01-13	0,7-29,5

Fonte Reed, Cleveland e Townsend (2011).

2.1.3 Diversidade de Diazotróficos em Ambientes Naturais

Os microrganismos diazotróficos são considerados um grupo relativamente pequeno, mas muito diverso morfológico, filogenética e fisiologicamente (MOREIRA et al, 2010). Neste grupo estão incluídos microrganismos heterotróficos aeróbicos (ex. *Azotobacter*), anaeróbicos (ex. *Clostridium*), anaeróbicos facultativos (ex. *Klebsiella*), fototróficos oxigênicos (*Anabaena*) e anoxigênicos (*Rhodobacter*) e quimiolitotróficos (ex. bactérias oxidantes de enxofre) (DIXON; KHAN, 2004, MARTINEZ, 2006, BERNHARD, 2010, REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). Os filos mais importantes do domínio Bacteria contendo diazotróficos são: Proteobacteria, Cyanobacteria, Chlorobi, Spirochaetes, Firmicutes e Actinobacteria (MARTINEZ, 2006, COELHO et al., 2009). No domínio Archaea, a FBN é restrita às arqueias metanogênicas (DIXON; KHAN, 2004, REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). A maioria dos diazotróficos é de vida-livre, ocorrendo no solo, rizosfera, filosfera, ou interior das plantas.

O solo é um ambiente heterogêneo, rico em diversidade microbiana (NACKE et al., 2011), com uma estimativa entre 2 mil e 8,3 milhões de espécies de bactérias aproximadamente por grama de solo (ROESCH et al., 2007). Os gêneros mais comuns de bactérias fixadoras de N₂ encontrados no solo são: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* e *Burkholderia*. Este último caracteriza-se por fixar N₂ de forma simbiótica ou assimbiótica (MOREIRA et al., 2010). Algumas bactérias com atividade celulolítica (*Clostridium*),

metilotróficas (*Methylococcus*, *Methylobacter*, *Methylomonas*) e envolvidas no ciclo do enxofre (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*) também apresentam habilidade em fixar o N₂.

As comunidades diazotróficas de cianobactérias são abundantes na filosfera, dermosfera, briófitas e troncos em decomposição (GOOSEMB; LAMB, 1986), sendo a maioria delas filogeneticamente afiliadas aos gêneros *Nostoc*, *Fischerella* e *Tolypohtrix* (FURNKRANZ et al., 2008). No bioma da Mata Atlântica, os gêneros *Chroococcidiopsis*, *Stygonema* e *Scytonema* foram encontrados na filosfera de *Guapira opposita* e *Euterpe edulis* (NARDELLI; 2011). Gammaproteobacteria diazotróficas heterotróficas também contribuem com a FBN neste compartimento junto com as cianobactérias (FURNKRANZ et al., 2008).

2.1.4 Restinga

A Mata Atlântica é uma floresta tropical úmida, considerada um “hotspot” de biodiversidade e endemismo do mundo (MYERS et al., 2000). Mas é também uma das mais ameaçadas de extinção dentre as florestas tropicais, pelo uso excessivo da terra pela agricultura e urbanização (BRUCE et al, 2010). Este bioma, que ocorre desde o litoral da região Nordeste até o Sul do Brasil, e estende-se até Argentina, Paraguai e Uruguai, pode ser visto como um mosaico diversificado de ecossistemas, com estruturas e composições florísticas diferenciadas em função do solo, relevo e condições climáticas (IBAMA, 2008). A maior parte dos remanescentes contínuos da Mata Atlântica localiza-se em São Paulo e Paraná. Dentre deles o Parque Estadual da Serra do Mar, no estado de São Paulo, é o mais protegido e preservado (NARDELLI, 2011).

A restinga é um ecossistema da Mata Atlântica caracterizado pela presença de plantas xerófitas, com capacidade de suportar altas temperaturas, salinidade baixa disponibilidade de nutrientes. Pode-se considerar como vegetação de restinga o conjunto de comunidades vegetais fisionomicamente distintas, sob influência marinha e flúvio-marinha, distribuídas em mosaico sucessional entre a praia e o continente (SOUZA et al., 2008). O relevo local é plano e pouco acentuado formando praias, cordões, depressões entre eles, dunas e lagoas (SUGGIO; TESSLER, 1984 apud MARTINS, 2010) e situando-se entre altitudes de 0-50 m acima do nível do mar (MARTINS et al., 2007) A floresta baixa da restinga é constituída por estratos predominantemente arbustivos e arbóreos, possui fisionomia arbórea com dossel não muito fechado, com uma altura média entre 10 e 15 m, e em árvores de grande porte ocorrem um grande número de epífitas (TALORA; MOLLERATO, 2000). As formações arbustivas abertas nas restingas brasileiras apresentam, geralmente, aspecto de mosaico, devido à

distribuição da vegetação em moitas a partir das discontinuidades na paisagem quanto à cobertura, fisionomia e/ou composição florística (CASTRO; SOUZA; TAVARES 2007). A diversidade de epífitas é grande, com destaque para as bromeliáceas, orquídeas e aráceas, as trepadeiras são escassas (MARTINS, 2010). A caracterização botânica e florística feita nas restingas paulistas tem permitido o conhecimento da mais rica das vegetações arenícolas marinhas (MARTINS, 2010).

O solo na restinga de Ubatuba caracteriza-se por ser do tipo Neossolo Quartzarênico, de textura arenosa em todas as profundidades (MARTINS, 2010) e apresentar lençol freático muito alto, tornando a área alagada durante a época chuvosa (verão). Devido às frequentes inundações, a pobreza dos solos limita o desenvolvimento de certos tipos de plantas e a ocorrência de certos grupos de animais (MARTINS et al., 2007).

A serapilheira forma uma fina camada, com grande quantidade de folhas não decompostas, podendo ocorrer acúmulo em alguns locais (SATO, 2007), além de formar canais superficiais que permanecem alagados (Figura 4) nos meses de maior precipitação (TALORA; MOLLERATO, 2000).



Figura 4 - Solo alagado de um trecho de Restinga (Coleta Março/2011).

As famílias de plantas mais importantes encontradas na restinga são: Myrtaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Annonaceae e Melastomataceae, e as espécies mais abundantes são *Eugenia brasiliensis*, *Myrcia racemosa*, *Alchornea triplinervia*, *Nectandra oppositifolia*, *Euplassa cantareirae* e *Myrcine ubellata*. Destaca-se a presença de árvores pequenas como

Guarea macrophylla, *Guatteria australis* e *Maitenus brasiliensis*, e ervas e arbustos das famílias Rubiaceae e Piperaceae (MORELLATO et al., 2000). Assis e colaboradores (2011) encontraram na floresta de restinga um total de 32 famílias de plantas, destacando-se a família Myrtaceae por ter o maior número de espécies (25%), e as espécies *Pera glabrata* (Euphorbiaceae), *Myrcia racemosa* (Myrtaceae), *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) e *Myrcia brasiliensis* (Myrtaceae), por serem indicadoras da restinga. Comparando-se a vegetação da restinga e outras áreas da Mata Atlântica, as espécies mais abundantes da restinga foram *Euterpe edulis*, *Guapira opposita*, *Garcinia gardneriana*, *Marlierea tomentosa*, *Sloanea guianensis* e *Eugenia fusca* (ASSIS et al. 2011).

Euterpe edulis (Mart.) (Arecaceae) é uma planta que se encontra em ambientes com baixa ou alta disponibilidade de nutrientes no solo (ZANELATO, 2010), solos alagados ou com alta umidade (MATOS; WATKINSON, 1998), e caracteriza-se por ter um número alto de epífitas associadas e elevada área foliar (MANIA; MONTEIRO, 2010), presença em diferentes altitudes da Mata Atlântica, desde o nível do mar (Restinga), até 1000 m (Montana). *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nigtinaceae) ocorre em ambientes que sofrem a influência da costa podendo apresentar variações na forma e tamanho da folha, dependendo da luminosidade na qual se encontra (RE-JORGE, 2010), já que uma característica importante de *G. opposita* é crescer em locais iluminados e sombreados (SANCHEZ et al., 2010).

Alguns trechos preservados de florestas de restinga são encontrados em Unidades de Conservação, contribuindo com a biodiversidade e servindo de fonte de espécies para recuperação de áreas de planícies arenosas costeiras e áreas de Mata Atlântica degradadas (SUGIYAMA, 2003).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) Núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo. A área utilizada compreendeu uma parcela permanente de 1 ha, com subparcelas de 10 x 10 m, localizada na restinga-parcela A (ao nível do mar) nas coordenadas 23° 21' 22" e 44° 51' 03", do projeto Temático Biota Gradiente Funcional coordenado por Carlos Alberto Joly (Unicamp) e Luiz Antonio Martinelli (CENA-USP). O solo da restinga é classificado como Neossolo

Quartzarênico hidromórfico típico, apresentando uma coloração mais escura no topo, brunada e com cores mais intensas em profundidade (EMBRAPA, 2006).

O clima da região é tropical chuvoso (Af, segundo a classificação de Köppen), apresentando chuvas bem distribuídas, com uma estação superúmida, de outubro a abril, e uma estação menos úmida, de maio a setembro (MORELLATO et al., 2000), não sendo suficientemente reduzidos para caracterizar uma estação de déficit hídrico (MANIA ; MONTEIRO, 2010). No mês menos chuvoso a precipitação foi 36,20 mm, no mês mais chuvoso foi de 700,00 mm (Figura 6). O mês mais frio apresentou uma temperatura média de 18,32 °C e o mês mais quente de 27,60 °C (Figura 6).

As coletas foram realizadas em duas épocas do ano. Em setembro de 2010 (baixa pluviosidade) e março de 2011 (alta pluviosidade) foram coletadas amostras de solo, dermosfera e filosfera sob a copa da árvore de *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) e *Euterpe edulis* (Arecaceae), de 9 indivíduos aleatórios. Amostras indeformadas de solo foram coletadas em anéis de 10 cm de altura e de 3,6 cm de diâmetro, após da remoção da serapilheira. Uma área de aproximadamente 15 x 10 cm de dermosfera das árvores foi retirada na altura do peito, com auxílio de uma faca. De cada planta de *G. opposita* foram retiradas da parte média da copa 25 folhas e de cada planta de *E. edulis* foram retirados 25 folíolos, distribuídas em três ramos, a uma altura aproximada de 8 m, com o auxílio de podão com tesoura de poda (Figura 7).

Outra amostragem foi realizada no final do mês de outubro/2010 (precipitação média mensal 200,00 mm e temperatura média mensal 21,52 °C – Figura 6) na forma de grid, em cada subparcela da parcela A da restinga a cada 10 m de distância. Amostras de serapilheira foram coletadas num quadrado de 62,5 cm² e de solo em anéis de 3 cm de altura e 3,6 cm de diâmetro (Figura 8). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, devidamente identificados, mantidas em caixas térmicas com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ para análises posteriores.

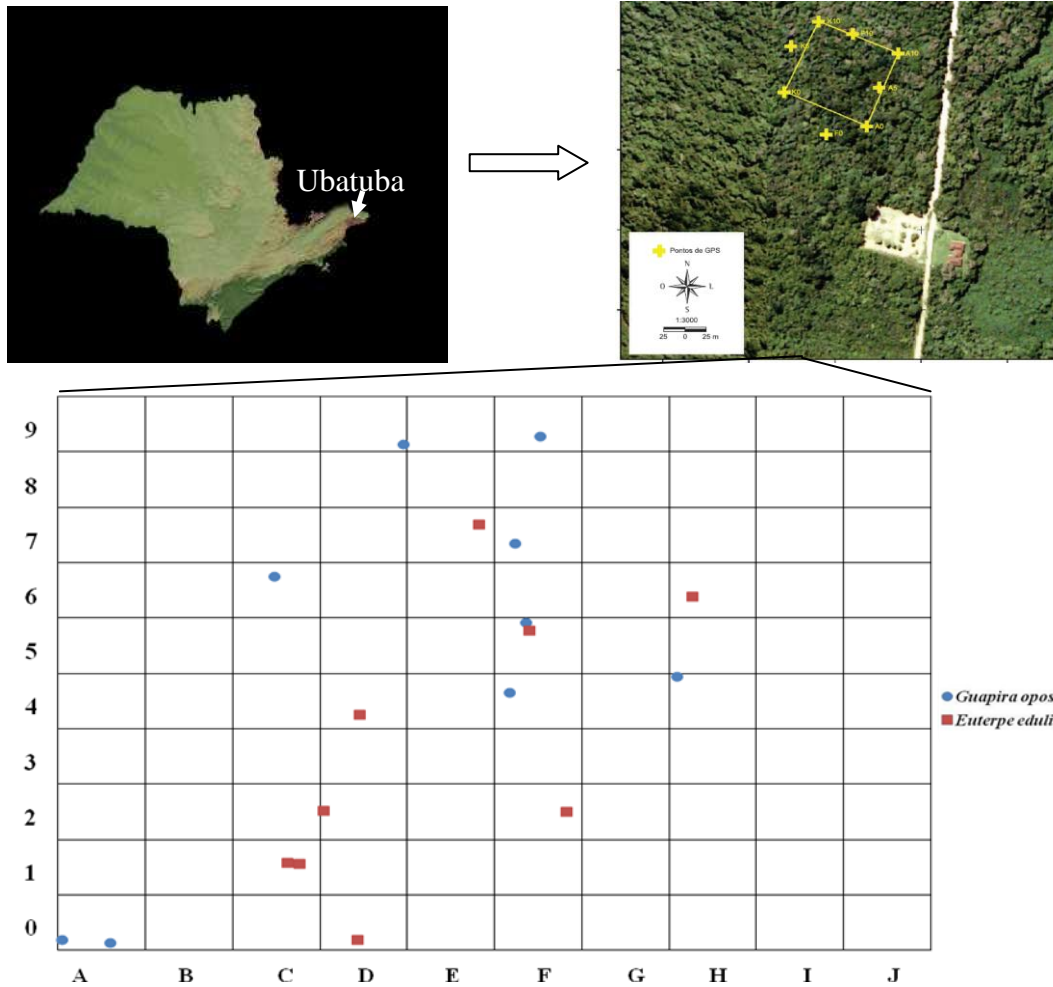


Figura 5 - Localização da parcela A da Restinga e distribuição das árvores amostradas no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba. Os números correspondem à orientação na distribuição das subparcelas de 10x10 m, dentro do Projeto Biota Gradiente Funcional.

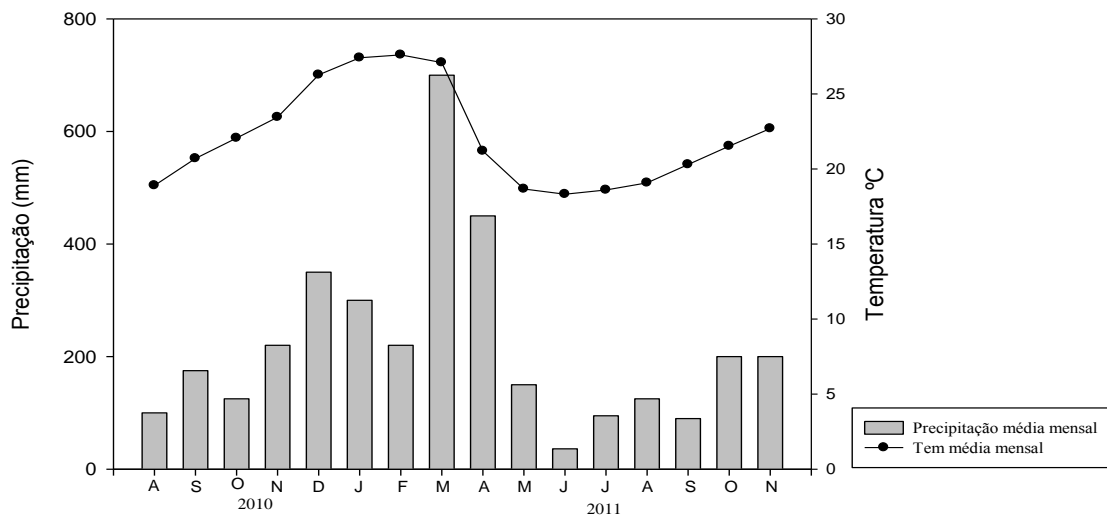


Figura 6 - Precipitação e temperatura média mensal no período entre 2010 e 2011 registradas no núcleo Picinguaba (PESM) Ubatuba, estado de São Paulo. Fonte: Projeto Serra do Mar.



Figura 7 - Amostragem nos três compartimentos das árvores *E. eudulis* e *G. opposita*. (A) Solo, (B) Dermosfera e (C) Filosfera.

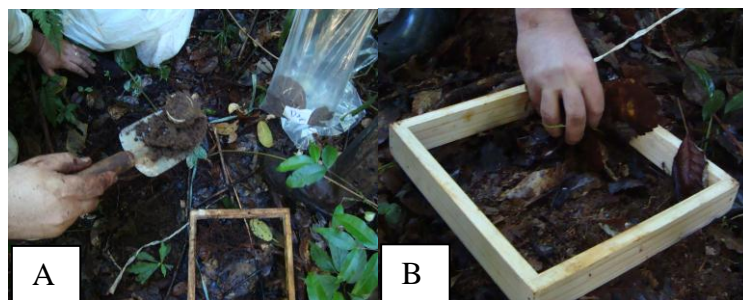


Figura 8 - Amostragem do (A) solo e (B) serapilheira em forma de grid na parcela A da restinga.

2.2.2 Determinação da Atividade da Nitrogenase

A técnica de redução de acetileno (ARA) (SCHINNER et al 1995) foi usada para determinação da atividade da nitrogenase e taxas de fixação de nitrogênio na filofosfera, dermosfera e solo sob a copa das árvores, e no solo e a serapilheira no grid. Cada amostra de dermosfera e filofosfera foi colocada num frasco selado de 250 mL. No caso do solo, cada amostra indeformada foi colocada em frascos de 1000 mL. A serapilheira e solo do grid foram colocados em frascos selados de 250 mL. Cada frasco tinha uma tampa montada com um septo e vedada para equilibrar a pressão atmosférica nos tubos. Nos frascos com as amostras, foi injetado o acetileno, numa concentração em volume de 10% (volume:volume). As amostras foram incubadas por 12 horas no local de amostragem em temperatura ambiente. As temperaturas do dia da incubação foram 21 °C e 25 °C, nas épocas de baixa e alta pluviosidade, respectivamente. As amostras do grid foram incubadas a 24 °C e 21 °C (temperatura ambiente - dia de incubação), em dois dias de coleta. Após a incubação, amostras de atmosfera dos frascos foram coletadas com o auxílio de uma seringa e injetadas em frascos de vidro previamente lacrados e com vácuo. A concentração de etileno nas amostras foi determinada injetando-se 1 mL de gases no cromatógrafo (Thermo Scientific),

equipado com um detector de ionização de chama (250 °C) e coluna N Poropak (120 °C; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.). Controles negativos (brancos) foram utilizados da injeção de amostras não incubadas com acetileno, etileno, folhas, solo ou dermosfera.

Os teores de umidade de todas as amostras foram determinados por gravimetria, após a secagem por 48 horas a 65 °C.

A taxa de redução de acetileno foi calculada e expressa em nanomol de acetileno reduzido (10^{-9} mol) por grama de massa seca de amostra por hora de incubação de acordo com a eq. (1),

$$\text{nmol etileno. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = (S-C) \cdot V \cdot P \cdot 100 / SW \cdot ml \cdot R \cdot T \cdot t \cdot \% dm, \quad (1)$$

em que S é a concentração de etileno depois da incubação, C é o valor do branco, V é o volume do espaço livre no frasco de vidro (ml), P é a pressão do ar em condições padrão (101.300 Pa), SW é a massa úmida do solo, dermosfera ou folha (g), ml é a quantidade de amostra injetada no cromatógrafo (1 ml), R é a constante universal dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T é a temperatura de incubação (°K), t é o tempo de incubação e % dm é o fator de massa seca do solo, dermosfera ou folha (2),

$$MS/MU \cdot 100, \dots\dots\dots(2)$$

em que MS é massa seca (solo, dermosfera e filosfera) e MU é a (massa úmida solo, dermosfera e filosfera).

A taxa de redução de acetileno foi convertida para quantidade de N_2 fixado em $\text{ng de N cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, para facilitar a comparação entre os compartimentos das espécies vegetais e solo, através da relação teórica 3:1, baseada na redução de 3 moles de acetileno para cada mol de N fixado multiplicado pela massa do N_2 (28) (HARDY et al., 1968). A área foliar das subamostras de cada espécie vegetal foi calculada usando o software CompuEye, Leaf & Symptom Area 11.001. Os dados do grid foram reportados em $\text{kg de N ha}^{-2} \text{ ano}^{-2}$.

2.2.3 Determinações da Razão Isotópica do N Estável e Determinação da Razão C/N

As amostras de solo, dermosfera e filosfera foram secas em estufa a 65°C por 48 horas e depois moídas a um fino pó. Logo após foi pesado entre 13 e 15 mg de solo; 3,0 a 3,5 mg de Dermosfera e 2,0 a 2,5 mg de folha, acondicionados em cápsulas de estanho. A determinação do C e N total e da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) foi realizada através de analisador elementar acoplado a um espectrômetro de massas (Carlo Erba, EA 1110, CHNS, CE

Instruments) e espectrometria de massas para razões isotópicas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan) do Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/USP.

A abundância natural de ^{15}N é expressa com desvios por mil (‰) de um padrão reconhecido internacionalmente, através da equação (2):

$$\delta = (\text{R amostra} / \text{R padrão} - 1) \times 1000 \quad (2)$$

em que R é a razão molar $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na amostra e no padrão. O padrão usado foi o ar atmosférico.

2.2.4 Análises Químicas do Solo

As amostras de solo foram secas em estufa a 65 °C, moídas e peneiradas em malha de 2 mm. A caracterização química do solo foi realizada conforme a metodologia proposta por Raij e colaboradores (2001). A acidez ativa do solo foi determinada através da medição do pH em solução de CaCl_2 (0,01M) e a acidez potencial do solo por medição de H+Al em solução SMP. A determinação da quantidade de matéria orgânica do solo (M.O.) foi feita pela oxidação a CO_2 por íons dicromato em meio ácido e posterior análise colorimétrica. Os elementos fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K) foram extraídos do solo por resina trocadora de íons. O Ca e o Mg foram mensurados por espectrofotometria de absorção atômica; o P foi quantificado por colorimetria usando molibdato; o K foi quantificado por fotômetro de chama. A partir das análises anteriores foram calculadas a soma de bases trocáveis (SB) a capacidade de troca catiônica total (T) e a porcentagem de saturação por bases (V%). O sulfato foi determinado por turbidimetria. O Fe, Mn, Zn e Cu, foram determinados por absorção atômica. A condutividade elétrica foi mensurada por potenciometria usando um condutivímetro (dS m^{-1}).

2.2.5 Análise Estatística

Análises de Variância (ANOVA) da taxa se FBN nos diferentes compartimentos da mesma espécie arbórea foi realizada, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para testar a variação entre as espécies, os dados foram analisados separadamente por compartimentos, em cada época de amostragem e as médias comparadas pelo teste de Student (t). A correlação entre as taxas de FBN e as propriedades químicas do solo foi determinada pelo teste de correlação de Spearman, através do software SigmaPlot 11 devido a que os dados não mostraram homogeneidade de variância e não foram transformados (Systat

Softwaer Inc, 2008). Usando o software Surfer 8 (GOLDEN SOFTWARE Inc, 2002), a distribuição espacial da fixação de N na serapilheira e no solo, dentro da parcela A da restinga foi determinada. Os dados dos atributos químicos do solo e abundância natural de ^{15}N foram testados para normalidade e homogeneidade de variância usando o teste de Levene, e transformados quando necessário. Os dados de abundância natural de ^{15}N foram submetidos a Análises de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados de análises químicas do solo foram analisados através da comparação de médias com o teste de Student. Foi feita uma análise de escala multidimensional (non-metric multidimensional scaling-NMDS) utilizando-se o programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltd, 2001) para avaliar a distribuição temporal e espacial da FBN no solo, na dermosfera e na filosfera de cada uma das espécies arbóreas. Foi feito uma análise de correspondência canônica para determinar diferenças estatísticas entre as variáveis ambientais usando-se o programa CANOCO versão 4.55 (PLANT RESEARCH INTERNATIONAL, 2006).

2.2.6 Desalojamento dos Microrganismos da Filosfera e Dermosfera

Entre 10 e 12 folhas (dependendo do tamanho da folha) e aproximadamente 20 gramas de fragmentos de dermosfera, de cada espécie arbórea, foram colocadas submersas em um Becker contendo 500 mL de solução tampão esterilizada de fosfato de potássio 0,1 M pH 7 e foram levadas para um sonicador homogenizador ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company. Illinois. USA) por 10 minutos a 22,5 kHz com a finalidade de desalojar as bactérias da superfície das folhas e da dermosfera. A solução tampão contendo a suspensão microbiana foi filtrada a vácuo utilizando-se uma membrana de Ester de celulose de 47 mm de diâmetro e com poros de 22 μm diâmetro (Millipore). Posteriormente as membranas foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração de DNA.

2.2.7 Extração de DNA Bacteriano do Solo

O DNA das amostras de solo foi extraído utilizando-se o kit MO BIO Powersoil DNATM Isolation, segundo o protocolo do fabricante (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos). A extração do DNA das amostras de filosfera e dermosfera foi feito utilizando-se o kit FastDNA[®] (Bio 101) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA foi determinada por fluorimetria, utilizando-se o fluorímetro Qubit (Life Technologies).

2.2.8 Amplificação do gene rRNA 16S por Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para Pirosequenciamento

A amplificação de fragmentos de 270 a 300 pb da região V4 do gene rRNA 16S foi realizada em solução contendo: 5,0 µl de solução tampão 1X, 7,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µl de dNTP (2,5 mM), 3U de Taq Polimerase High Fidelity, 1 µl do iniciador direto (10 pmol/µl) (Tabela 3), uma mistura de 0,5 µl 4 iniciadores reversos (10 pmol/ µl) (Tabela 4) e entre 5-25 ng de DNA total (JESUS et al., 2010). A amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16S foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 3 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturação por 45 s a 95°C; pareamento por 1 min e 45 s a 57°C, e extensão durante 1 min a 72°C; a extensão final foi a 72°C durante 4 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Ao iniciador direto (520F) para a reação do pirosequenciamento, foi adicionado um adaptador conforme recomendações do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Também foi adicionado ao mesmo iniciador uma sequência *tag* de 8 pares de bases (no total foram usados 12 tags), utilizada para a identificação da origem de cada uma das sequências obtidas (Tabela 3), nas análises de bioinformática. O pirosequenciamento foi realizado pela empresa Helixxa (Campinas. SP), utilizando-se um pirosequenciador GS FLX Titanium (Roche, EUA).

Tabela 3 - Iniciadores diretos usados na PCR junto com a sequência adaptadora e a sequência *tag*.

	Adaptador	Tag	Iniciador
520F-Mid1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	AGAGAGAG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	ATGAGAGC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CATCTCTG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	AGCATGAG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CAGAGAGC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	ATCAGATC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CTCAGCAG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	AGATCATC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	ATGCTCTC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	AGCAGAGC	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CATGCATG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-Mid12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CTGAGCTG	AYTGGGYDTAAAGNG

Tabela 4 - Iniciadores reversos usados na PCR junto com a sequência adaptadora

	Adaptador	Iniciadores
820R-1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	TACCRGGGTHTCTAATCC
820R-2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	TACCAGAGTATCTAATTC
820R-3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	CTACDSRGGTMTCTAATC
820R-4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG	TACNVGGGTATCTAATCC

2.2.9 Análise de Sequências

As análises das sequências foram feitas utilizando-se o programa MOTHUR versão 1.21.1 (SCHLOSS et al., 2009). Antes das análises, as sequências referentes aos *tags* e iniciadores foram removidas de cada *read*. As sequências válidas foram alinhadas contra o banco de dados Silva para Bactérias (<http://www.arb-silva.de/>). Depois do alinhamento as sequências foram analisadas quanto à presença de quimeras. Foi calculada a matriz de distância pelo método de comparações de pares (“pairwise distance”). Com as sequências limpas foi feita a classificação taxonômica de cada *read*. As sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) e afiliadas a grupos taxonômicos específicos, considerando-se 97% de similaridade, utilizando o algoritmo “average neighbor”. Depois de se obter esses dados foram determinadas as estimativas de riqueza de espécies ACE e Chao1, e os índices de diversidade de Shannon (H') e o recíproco de Simpson ($1/D$) e foram construídas as curvas de rarefação. Foi determinada também a cobertura de amostragem e os números de UTOs comuns a diferentes amostras. A comparação entre os compartimentos, entre espécies e dentro de cada espécie, foi feita utilizando-se o programa LIBSHUFF integrado ao MOTHUR.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análises Químicas do Solo

Em relação aos atributos químicos do solo rizosférico (0-10 cm) amostrado sob a projeção da copa das espécies arbóreas, foram observadas diferenças significativas nos teores de Ca e S, em função da época de coleta, nas amostras sob a copa de *E. edulis* e *G. opposita*, respectivamente (Tabela 5). O teor de S foi baixo como mostrado por Martins (2010) na mesma área. As principais características do solo foram o pH baixo (3,6) e baixa quantidade de P, condições comuns em florestas tropicais (MARTINS, 2010). O alto conteúdo de matéria orgânica desses solos ($> 90 \text{ g dm}^{-3}$ - Tabela 5) pode ser a razão de observar essa exuberância

do ecossistema (CAMPBELL et al., 1967). A condutividade elétrica do solo não variou significativamente em função da pluviosidade. Foram observados valores elevados de capacidade de troca catiônica total (T), principalmente em função da acidez potencial (H+Al), já que os valores da soma de bases trocáveis (SB) foram baixos. Em referência à concentração de micronutrientes não foram observadas diferenças significativas (Tabela 5).

Foram observadas correlações entre as taxas de FBN e alguns dos atributos químicos do solo. Observou-se correlação positiva entre a FBN e H+Al (coeficiente de correlação 0,683; $P=0,0361$) e uma correlação negativa entre a FBN e V% (coeficiente de correlação - 0,683; $P=0,0360$) no caso de *G. opposita*, na época de baixa pluviosidade. Já no solo sob a copa de *E. edulis* encontrou-se uma correlação positiva entre a FBN e pH (coeficiente de correlação 0,700; $P=0,030$) na época de baixa pluviosidade, e FBN e SB (coeficiente de correlação 0,538; $P=0,000000200$). O teor de P no solo influi diretamente na FBN por se tratar de um elemento necessário na síntese de ATP (VITOUSEK; HOBBIIE, 2000), podendo exercer o controle desta função juntamente com o Mo e Fe, constituintes da subunidade α da nitrogenase (RAYMOND et al., 2004; BARRON et al., 2009). Considerando-se a faixa de valores referência de P – resina (mg.dm^{-3}) para interpretação da fertilidade de solos agrícolas (0-20 baixo, 21-40 médio, >40 alto), os valores de P determinados nas amostras de solo (Tabela 5) sugerem que este elemento pode ser um fator limitante da FBN no solo da restinga.

Tabela 5 - Atributos químicos das amostras do solo da Restinga

Atributo	<i>E. edulis</i>		<i>G. opposita</i>	
	BP	AP	BP	AP
pH	3,5±0,1a	3,6±0,08a	3,6±0,08a	3,5±0,06a
MO (g dm⁻³)	106,8±10,5a	99,5±9,4a	105,1±12,7a	90,5±5,9a
P (mg dm⁻³)	6±1,2a	6±1a	7±1,4a	6±0,7a
Ca (mmolc dm⁻³)	1,4±0,2b	3,1±0,9a	2,9±0,65a	1,8±0,3a
Mg (mmolc dm⁻³)	3,0±0,7a	3,9±0,8a	4,2±0,8a	5,3±1,9a
K (mmolc dm⁻³)	2,7±0,2a	2,8±0,2a	3,0±0,2a	6,0±3,4a
S (mg dm⁻³)	24,6±1,9a	26,5±4,1a	25,6±1,9a	18,8±1,6b
H+Al (mmolc dm⁻³)	184,6±31,8a	169,1±21,1a	169,8±17,9a	182,9±14,8a
T (mmolc dm⁻³)	1459,9±505,5a	1859±530,8a	1907±473,4a	2423,5±817,6a
SB (mmolc dm⁻³)	6,9±0,9a	9,8±1,8a	10,1±1,5a	13,1±3,8a
CE (dS m⁻¹)	0,21±0,04a	0,29±0,04a	0,20±0,04a	0,25±0,04a
V%	0,62±0,06a	0,67±0,09a	0,64±0,07a	0,59±0,06a
Fe (mg kg⁻¹)	359,8±106,5a	460,7±49,5a	403,3±57,7a	520,3±39,1a
Mn (mg kg⁻¹)	2,7±0,9a	2,0±0,6a	2,8±0,7a	1,3±0,5a
Zn (mg kg⁻¹)	2,5±0,6a	2,9±0,9a	2,9±0,4a	3,00±0,4a
Cu (mg kg⁻¹)	0,3±0,02a	0,3±0,04a	0,3±0,03a	0,2±0,03a

Média dos valores ± erro padrão (n=9). Médias seguidas da mesma letra significam que não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre amostras da mesma espécie, nas diferentes épocas de coleta. BP=Baixa pluviosidade, AP=Alta pluviosidade, T=Capacidade de troca catiônica total (SB + H⁺ + Al³⁺), SB=Soma de bases trocáveis (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺), CE=Condutividade elétrica, V%=Porcentagem de saturação por bases.

2.3.2 FBN nos Compartimentos das espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita*

De modo geral, na filosfera, as taxas de fixação de N₂ calculadas com base na redução de acetileno na primeira época de coleta foram intermediárias (*E. edulis* 4,5 ± 2,0 ng cm⁻² h⁻¹ e *G. opposita* 7,5 ± 1,3 ng cm⁻² h⁻¹) quando comparadas com os outros dois compartimentos (Tabela 6). Na segunda época de coleta, a fixação de N₂ diminuiu em *E. edulis* (3,6 ± 0,6 ng cm⁻² h⁻¹), mas aumentou significativamente em *G. opposita* (52,0 ± 12 ng cm⁻² h⁻¹) ($P < 0,001$).

Na dermosfera, observou-se uma taxa de fixação de N₂ mais elevada (*E. edulis* 175,1 ± 53,4 ng cm⁻² h⁻¹ e *G. opposita* 50,6 ± 12,4 ng cm⁻² h⁻¹; *E. edulis* 97,2 ± 20,9 ng cm⁻² h⁻¹ e *G. opposita* 72,5 ± 18,8 ng cm⁻² h⁻¹, na primeira e segunda época de coleta, respectivamente) se

comparada com filosfera e solo (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas na FBN neste compartimento em função das espécies ou época de coleta.

A taxa de FBN no solo foi a mais baixa dos três compartimentos, com exceção de *E. edulis* (*E. edulis* $6,8 \pm 2,9 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) na época de alta pluviosidade, já que a FBN no solo foi maior do que na filosfera (Tabela 6). Quando comparadas as duas épocas de coleta, observou-se um aumento significativo da FBN na época de alta pluviosidade (Tabela 6).

A maior FBN na filosfera de *G. opposita*, na dermosfera de *E. edulis* e no solo sob a copa da árvore na segunda época de coleta (Tabela 6), indicam uma variação significativa da FBN ao longo do perfil vertical das espécies vegetais, alias da variação entre as espécies e as épocas de amostragem (Tabela 6).

Tabela 6 - Taxas de FBN assimbiótica nos três compartimentos de *E. edulis* e *G. opposita*, em ambas as duas épocas de coleta.

	Filosfera		Dermosfera		Solo	
	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade
	$\text{ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$					
<i>E. edulis</i>	$4,5 \pm 2,0\text{Aa}$	$3,6 \pm 0,6\text{Ab}$	$175,1 \pm 53,4\text{Aa}$	$97,2 \pm 20,9\text{Aa}$	$1,2 \pm 0,3\text{Ba}$	$6,8 \pm 2,9\text{Aa}$
<i>G. opposita</i>	$7,5 \pm 1,3\text{Ba}$	$52,0 \pm 1,2\text{Aa}$	$50,6 \pm 12,4\text{Aa}$	$72,5 \pm 18,8\text{Aa}$	$1,5 \pm 0,4\text{Ba}$	$3,4 \pm 0,8\text{Aa}$

As taxas de FBN estão dadas em médias \pm erro padrão. Diferenças significativas (t test, $p < 0,05$) nos compartimentos são identificadas com letras diferentes. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as épocas de coleta, por compartimento e letras minúsculas indicam diferenças entre as espécies vegetais na mesma época de coleta.

2.3.2.1 Filosfera

Os dados de taxas de FBN na filosfera oscilaram entre 0,08 e 275,00 $\text{ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Em ambas as épocas de coleta, a FBN na filosfera de *G. opposita* foi maior do que na filosfera de *E. edulis*. Taxas de FBN na filosfera em florestas úmidas tropicais têm sido reportadas como as mais baixas do perfil vertical (CUSACK; SILVER; MCDOWELL, 2009; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008), levando à consideração de que a relação C:N foliar é um dos fatores de maior influência na fixação de N_2 neste compartimento (CUSACK; SILVER; MCDOWELL, 2009).

A relação C:N, nas duas épocas de coleta, foi significativamente mais alta na filosfera de *E. edulis*, quando comparada com *G. opposita* ($P = 0,001$) (Tabela 7). *G. opposita*, a espécie arbórea com maior fixação de N_2 na filosfera, mostrou a relação C:N mais baixa, enquanto em *E. edulis* a relação C:N foi mais alta coincidindo com o reportado por Cusack, Silver e McDowell (2009) em uma floresta em Porto Rico, onde o compartimento com a

maior FBN, (solo) mostrou a relação C:N mais baixa (entre 15 e 21), enquanto os líquens que apresentaram a relação C:N mais alta (82) mostraram a FBN mais baixa. No entanto, esses autores encontraram que, entre as árvores as espécies com maior relação C:N na filosfera, também apresentaram maior taxa de FBN.

O percentual de N na filosfera de *G. opposita* foi significativamente mais alto do que na de *E. edulis* em ambas as épocas de coleta. A espécie *G. opposita* caracterizou-se por um elevado conteúdo de N na folha, maior do que algumas espécies de leguminosas (AIDAR et al., 2003). O maior conteúdo de N na filosfera está relacionado com o investimento que a planta faz em compostos fotosintéticos para esse processo na parte aérea da planta (THOMPSON; KRIEDERMAN; CHAIG, 1992).

Baseado na análise bidimensional (NMDS) (Figura 9) é possível observar que a separação significativa por época de amostragem foi mais evidente na espécie arbórea *G. opposita* que em *E. edulis* (stress: 0,01). A análise de correspondência canônica (ACC), considerando as variáveis %N, %C, C:N e atividade da nitrogenase (ARA) (Figura 10), revelou que a distribuição das amostras da filosfera é explicada em 53,85% por essas variáveis, sendo o 100% do valor anterior explicado pelo eixo 2. A partir da ACC é possível observar a maior influência da relação C:N na espécie *E. edulis*, independente da época de coleta, em relação da espécie *G. opposita* (Figura 10). O ARA ($P=0,012$) foi a única variável significativa segundo o teste de permutações de Monte Carlo. No resultado dessa análise observa-se também uma separação entre as duas espécies vegetais (Figura 10) indicando que possivelmente atributos específicos de cada planta influenciariam na FBN.

Tabela 7 - Percentual de N (%N), relação C:N e porcentual de C (%C) na filosfera de *E. edulis* e *G. opposita*, nas duas épocas de coleta.

	<i>Euterpe edulis</i>		<i>Guapira opposita</i>	
	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade
%N	2,0±0,09Aa	2,0±0,05Ba	3,9±0,3Aa	3,5±0,3Aa
%C	43,1±1,1Aa	42,1±0,7Aa	43,6±0,8Aa	41,1±0,4Aa
C:N	21,8±0,7Aa	21,2±0,6Aa	11,7±0,8Ba	12,4±1,0Ba

Os dados representam as médias ± desvio padrão. Letras maiúsculas iguais entre espécies vegetais não diferem significativamente, na mesma época de coleta (t-test, $P < 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre épocas, dentro da mesma espécie vegetal (t-test, $P < 0,05$).

Diversos fatores influenciam a FBN na filosfera além da disponibilidade de água na folha e da relação C:N. Efeitos significativos e positivos da intensidade luminosa, idade da folha (BENTLEY, 1987), conteúdo de P foliar (REED et al., 2007) ou disponibilidade de C (LINDOW; BRANDL, 2003) sobre a fixação biológica na filosfera tem sido reportados.

Mudanças no perfil químico foliar das espécies arbóreas, assim como, variações na forma e na textura da folha poderiam explicar as diferenças que ocorrem nas taxas da FBN entre as duas espécies vegetais (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008). No caso das duas espécies vegetais avaliadas neste estudo, as folhas de *G. opposita* são mais grossas do que *E. edulis* e caracterizam-se por apresentar textura subcoriácea (SANTOS et al., 2010); já no caso de *E. edulis* os folíolos caracterizam-se por serem mais finos e de textura coriácea. Variações entre as taxas de fixação de N, entre três espécies de plantas, em uma floresta úmida na Costa Rica, foram observadas por Furnkranz e colaboradores (2008). Reed, Cleveland e Townsend, (2008) também atribuem a características das espécies vegetais, as variações que ocorrem nas estimativas do ARA no dossel da floresta úmida tropical.

Essa variação pode ser explicada por alterações na estrutura das comunidades de diazotróficos na filosfera em função da variação das condições ambientais (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008). A colonização da filosfera pelas bactérias depende da fonte de C que a planta hospedeira proporciona e da forma como as bactérias aproveitam essa fonte de C, modificando o ambiente das folhas (LINDOW, 1994). Em estudos na Mata Atlântica, utilizando métodos moleculares, Lambais e colaboradores (2006) e Nunes (2010) observaram uma grande associação entre a comunidade bacteriana da filosfera e a espécie vegetal. É possível que as comunidades de diazotróficos da filosfera também estejam associadas com a espécie vegetal.

Taxas elevadas de FBN na filosfera têm sido correlacionadas com a alta proporção de cianobactérias (FREIBERG, 1998). Além das cianobactérias, bactérias heterotróficas habitando a filosfera também podem contribuir com a fixação de N₂.

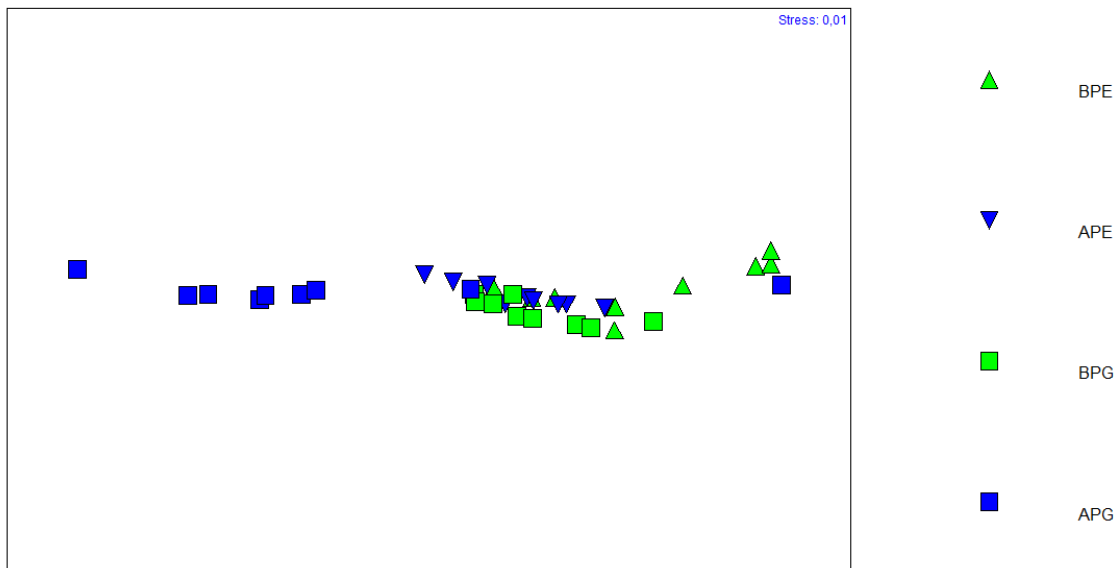


Figura 9 – Análise de escala multidimensional (NMS) da distribuição das amostras das duas espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita* nas duas épocas de coleta. BPE Baixa pluviosidade *Euterpe*, BPG Baixa pluviosidade *Guapira*, APE Alta pluviosidade *Euterpe*, APG Alta pluviosidade *Guapira*.

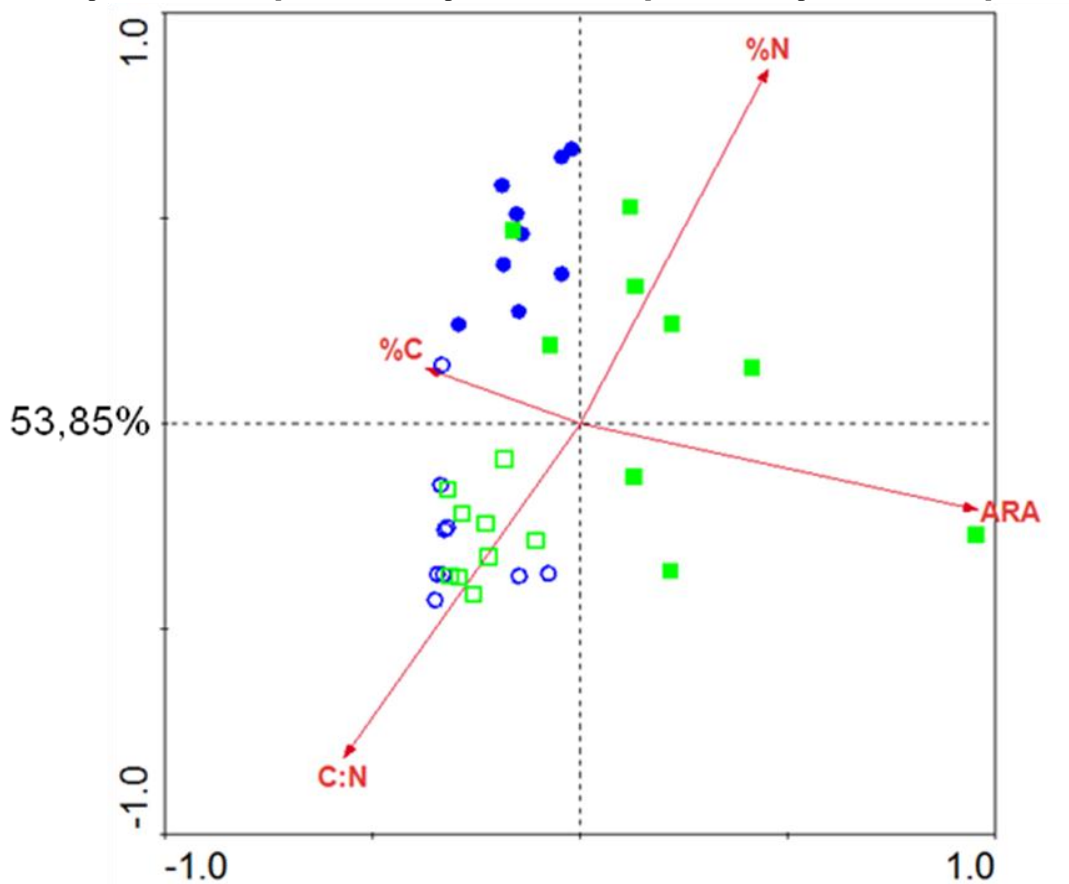


Figura 10 - Análises de Correspondência Canônica (ACC) comparando as variáveis %N, %C, C:N e ARA que determinam a distribuição das espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita*. Os pontos azuis indicam época de baixa pluviosidade, cheios indicam *G. opposita*, vazios indicam *E. edulis*. Os quadrados verdes indicam época de alta pluviosidade, cheios indicam *G. opposita*, vazios indicam *E. edulis*.

2.3.2.2 Dermosfera

Os dados de taxas de FBN na dermosfera oscilaram entre 1,89 e 828,96 ng N cm⁻² h⁻¹. Embora a FBN nesse compartimento fosse maior ao longo do perfil vertical (Tabela 6) observou-se que em *E. edulis* a FBN diminuiu na segunda época de coleta; já em *G. opposita* o resultado foi contrário mas não ultrapassou a taxa de FBN reportada na dermosfera de *E. edulis*.

Também não foram observadas diferenças significativas na % de N nem na relação C:N da dermosfera entre as espécies estudadas (Tabela 8). A %C na dermosfera de *G. opposita* ($P = 0,001$) foi significativamente mais alta que em *E. edulis* na época de alta pluviosidade (Tabela 8).

Baseada na representação bidimensional (NMDS) da FBN na dermosfera, não foi observada uma distribuição ampla das amostras de cada uma das espécies arbóreas, nem ocorreu separação por época de coleta ou por espécies vegetais (Figura 11). A ACC considerando as variáveis %N, %C, C:N e ARA, não contribuiu no agrupamento entre as amostras por época de coleta ou espécie vegetal (Figura 12) coincidindo com o observado na análise de NMDS (Figura 11). A variável que foi significativa na distribuição dos dados, segundo o teste de permutação de Monte Carlo, foi o ARA ($P=0,012$). A distribuição das amostras da dermosfera é explicada em 39,44% pelas variáveis ambientais e dessa porcentagem, 95,2% é explicado pelo eixo 1 (Figura 12). Nenhuma das demais variáveis avaliadas influenciou fortemente a FBN na dermosfera (Figura 12).

A presença de líquens, algas e briófitas associadas à dermosfera das espécies vegetais nas florestas tropicais é dependente da umidade do ambiente, se a umidade do ambiente aumenta, aumenta a incidência desses organismos (SON, 2001), o que poderia resultar também no aumento na fixação de N₂. Dependendo do tipo de organismo líquen, alga ou briófito associado à espécie vegetal, a composição de bactérias fixadoras de N₂ associadas com esses organismos seria diferente para cada planta, esse fato poderia influenciar nas taxas de FBN (WU, ZHANG, DOWNING, 2009). Um importante fornecimento de N por meio da FBN foi reportado em líquens (0–2 kg N ha⁻¹ ano⁻¹) e briofitas (0,7–10 kg N ha⁻¹ ano⁻¹) quando colonizados por cianobactérias (DUNCAN; MENGE; HEDIN 2009). Esses autores explicam que a maior FBN associada com líquens e briófitos na dermosfera, possivelmente deve-se à maior área de superfície habitável para epifíticos no dossel da floresta, junto com aumento na umidade desse local. Becker (1980) observou variação na FBN de bactérias associadas a líquens na dermosfera em função da umidade do substrato. Altas taxas de FBN

em briófitas (valores meios entre 20,5 e 26,3 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) têm sido reportadas em florestas tropicais, mas não em associação à dermosfera (CUSACK; SILVER; MCDOWELL, 2009).

Tabela 8 - Percentual de N (%N), relação C:N e percentual de C (%C) na dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita* em cada época de coleta

	<i>Euterpe edulis</i>		<i>Guapira opposita</i>	
	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade
%N	2,3±0,1Aa	2,3±0,09Aa	2,4±0,2Aa	2,1±0,1Aa
%C	41,0±1,1Aa	40,6±0,4Ba	42,5±1,1Aa	44,8±0,2Aa
C:N	18,2±1,2Aa	17,5±0,8Aa	18,4±1,5Aa	19,5±1,4Aa

Os dados representam as médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas iguais entre espécies vegetais não diferem significativamente, na mesma época de coleta (t-test, $P < 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre épocas, dentro da mesma espécie vegetal (t-test, $P < 0,05$).

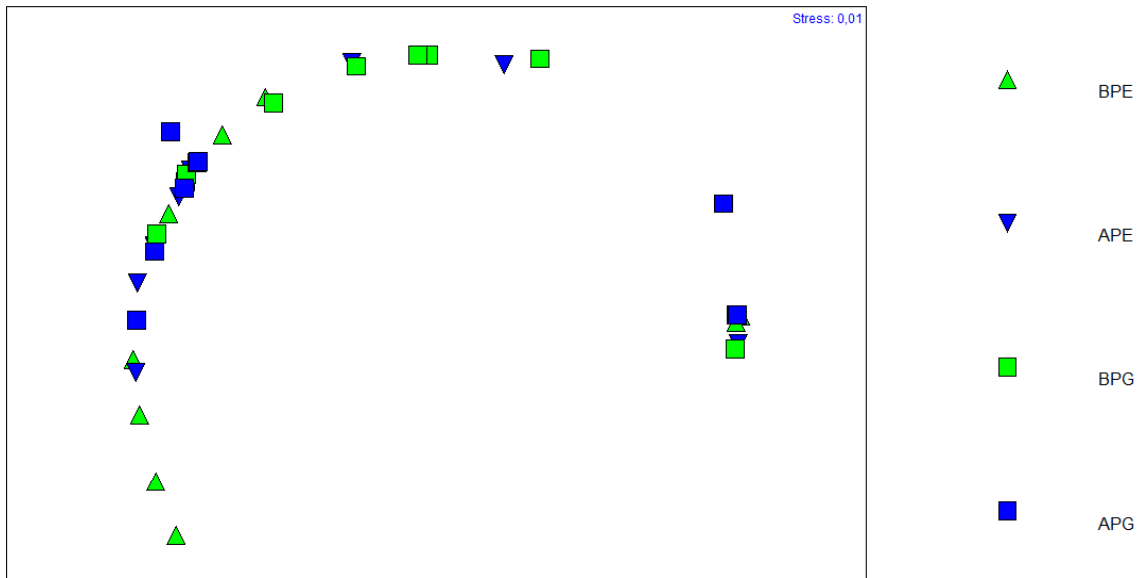


Figura 11 - Análise de escala multidimensional (NMDS) da distribuição das duas espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita* nas duas épocas de coleta. BPE Baixa pluviosidade *Euterpe*, BPG Baixa pluviosidade *Guapira*, APE Alta pluviosidade *Euterpe*, APG Alta pluviosidade *Guapira*.

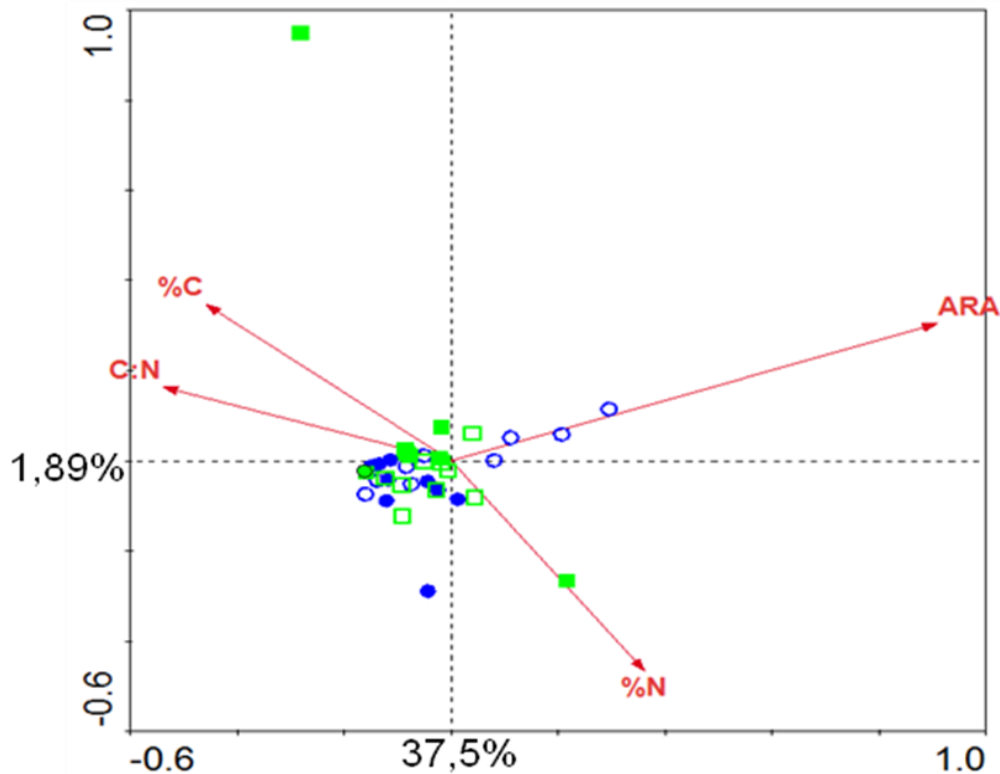


Figura 12 –Análises de Correspondência Canônica (ACC) comparando as variáveis %N, %C, C:N e ARA que determinam a distribuição das espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita*. Os pontos azuis indicam época de baixa pluviosidade, cheios indicam *G. opposita*, vazios indicam *E. edulis*. Os quadrados verdes indicam época de alta pluviosidade, cheios indicam *G. opposita* vazios indicam *E. edulis*.

2.3.2.3 Solo

Os dados de taxas de FBN no solo sob a copa das árvores oscilaram entre 0,12 e 22,02 $\text{ng N cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, observando-se a maior fixação no solo sob a copa da árvore de *E. edulis*. Estudos em florestas tropicais de Porto Rico (CUSACK; SILVER; MCDOWELL, 2009) e da Costa Rica (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008) mostram que as taxas FBN foram maiores (entre 20,2 e 61,8; $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) ou intermediárias (0,74 $\text{ng g}^{-1} \text{h}^{-1}$), no solo dessas florestas, respectivamente.

A relação C:N não variou significativamente em relação as espécies ou época de amostragem (Tabela 9). A baixa relação C:N poderia desfavorecer o desenvolvimento das bactérias fixadoras de N_2 no solo e se ver refletido na fixação de N, já que é o teor de C, como fonte de energia para as bactérias heterotróficas, que regula a competição por nutrientes no solo entre microrganismos fixadores e não fixadores de N_2 (MULDER, 1975). Quando a concentração de CO_2 é elevada no solo e a água é limitante, a competição por substratos orgânicos entre microrganismos heterotróficos limita a resposta dos microrganismos diazotróficos (HOFMOCKEL; SCHLESINGER, 2007).

A importância da umidade no solo, que neste caso foi alta, devido ao alagamento do solo na restinga, pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de oxigênio no solo, favorecendo a atividade de diazotróficos anaeróbios (HOFMOCKEL; SCHLESINGER, 2007). Embora o conteúdo de umidade influencie a FBN no solo, ele não é o único fator que explica a variabilidade na fixação de N (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008). Teores de P (REED et al., 2007), Mo e Fe (BARRON et al., 2009) e pH (BHATIA; RUPPEL; NARULA, 2009) também influenciam na FBN no solo juntamente com a relação C:N.

O biplot das amostras do solo não demonstrou agrupamento por época de coleta, nem por espécie arbórea (Figura 13). A análise de correspondência canônica, considerando as variáveis %N, %C, C:N, ARA e umidade, pouco contribuiu para a compreensão da distribuição das amostras do solo (Figura 14) apesar da variável ARA ter influenciado significativamente a distribuição observada, segundo o teste de Monte Carlo ($P = 0,0120$). As variáveis escolhidas foram capazes de explicar 60,61% da distribuição dos dados, sendo o 70,9% desta variação explicada pelo eixo1.

Tabela 9 - Porcentagem de N (%N), relação C:N e porcentagem de C (%C) no solo (0-10cm) de *E. edulis* e *G. opposita* em cada época de coleta

	<i>Euterpe edulis</i>		<i>Guapira opposita</i>	
	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade	Baixa Pluviosidade	Alta Pluviosidade
%N	0,3±0,03Aa	0,3±0,02Aa	0,3±0,02Aa	0,3±0,02Aa
%C	5,1±0,8Aa	4,4±0,4Aa	4,5±0,5Aa	4,6±0,9Aa
C:N	18,7±1,0Aa	18,9±1,4Aa	17,7±0,7Aa	17,8±0,5Aa

Os dados representam as médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas iguais entre espécies vegetais não diferem significativamente, na mesma época de coleta (t-test, $P < 0,05$). Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre épocas, dentro da mesma espécie vegetal (t-test, $P < 0,05$).

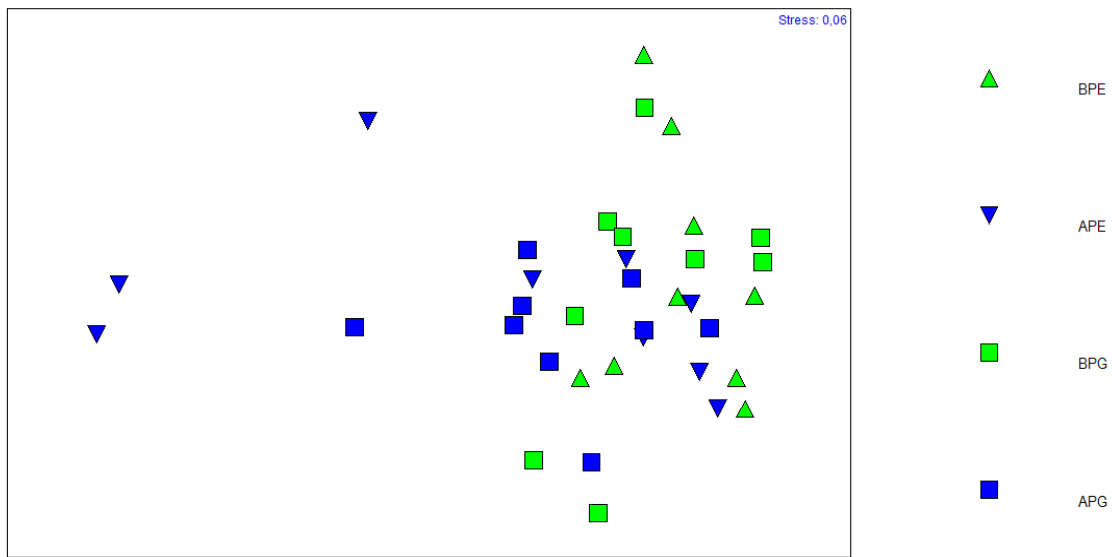


Figura 13 - Análise de escala multidimensional (NMDS) da distribuição das duas espécies arbóreas *E. edulis* e *G. opposita* nas duas épocas de coleta. BPE Baixa pluviosidade *Euterpe*, BPG baixa pluviosidade *Guapira*, APE Alta pluviosidade *Euterpe*, APG Alta pluviosidade *Guapira*.

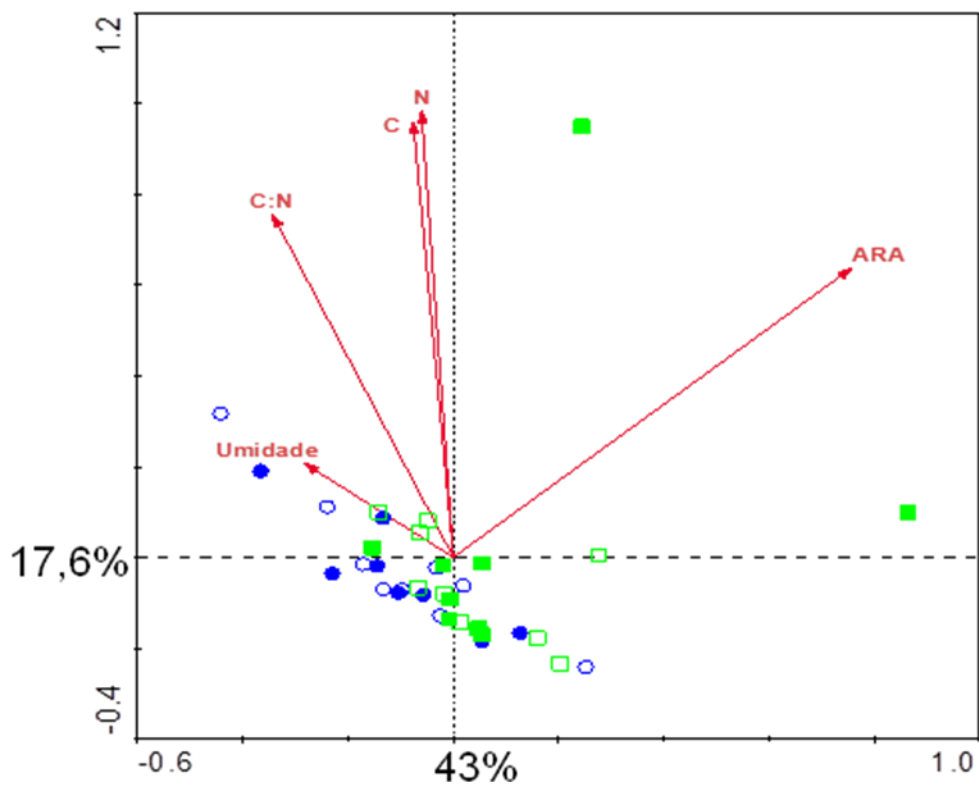


Figura 14 - Correspondência Canônica (ACC) comparando as variáveis C:N %N, %C, ARA e Umidade que determinam a distribuição das espécies arbóreas *E. edulis* e *G. opposita*. Os pontos azuis indicam época de baixa pluviosidade, cheios indicam *G. opposita*, vazios indicam *E. edulis*. Os quadrados verdes indicam época de alta pluviosidade, cheios indicam *G. opposita* vazios indicam *E. edulis*.

2.3.3 Abundância Natural ($^{15}\text{N}\%$) entre os Compartimentos das Espécies Arbóreas

Na época de baixa pluviosidade, as amostras do solo sob a copa das espécies arbóreas apresentaram valores mais elevados de $\delta^{15}\text{N}$ (*E. edulis* $2,9\pm 0,2\%$; *G. opposita* $2,7\pm 0,3\%$), enquanto valores mais baixos foram observados na filosfera (*E. edulis* $-1,3\pm 0,5\%$; *G. opposita* $1,5\pm 0,3\%$) (Figura 17). Comparando as duas espécies arbóreas na época de baixa pluviosidade, observou-se que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ na dermosfera ($P = 0,011$) e filosfera ($P < 0,001$) de *G. opposita* foram significativamente mais altos do que em *E. edulis* (Anexo D). Na época de alta pluviosidade tanto em *E. edulis* ($2,7\pm 0,3\%$) quanto em *G. opposita* ($2,8\pm 0,2\%$) observaram-se variações significativas no $\delta^{15}\text{N}$ do solo, quando comparado com os outros compartimentos (Figura 18). Comparando as espécies arbóreas, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ na dermosfera ($P=0,001$) e filosfera ($P=0,011$) de *G. opposita* foram significativamente mais altos do que em *E. edulis* (Anexo A).

O maior conteúdo de ^{15}N observou-se nas amostras de solo (0-10 cm), sob a copa das duas espécies arbóreas. Também foi nesse compartimento que se apresentou menor atividade da nitrogenase. O baixo conteúdo de $\delta^{15}\text{N}$ na dermosfera e filosfera de *E. edulis*, sugerem a possibilidade de aporte de N via FBN pelo solo (AIDAR et al., 2003). O $\delta^{15}\text{N}$ observado aqui foi muito baixo quando comparado com outros dados de $\delta^{15}\text{N}$ do solo à mesma profundidade (6,2 a 10,3 %) num campo irrigado de soja (SUTHERLAND; KESSEL; PENNOCK, 1991), além de ter sido reportado que o valor de $\delta^{15}\text{N}$ aumenta com a profundidade do solo (HOGBERG, 1997; NARDOTO et al., 2008; MARDEGAN et al., 2009) indicando que o enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}$ no perfil do solo é devido à incompleta oxidação de NH_4^+ mineralizado resultando em um enriquecimento da região do solo onde o íon fica retido ou é devido ao efeito da diluição isotópica entre a camada de serapilheira e solo (MARTINS, 2010).

Na dermosfera e filosfera de *E. edulis*, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram menores que 0‰ e em *G. opposita* não superaram o 2 ‰. Em espécies de leguminosas em sistemas limitados por N é normal encontrar valores de $\delta^{15}\text{N}$ na folha entre 0 e 2 ‰ (CAMPOS, 2009), enquanto que em espécies não leguminosas, a variabilidade do valor de $\delta^{15}\text{N}$ é maior (MARTINELLI et al., 1999). No entanto, neste trabalho a variabilidade do $\delta^{15}\text{N}$ na folha foi entre -1,3 e 1,5 ‰ e na dermosfera entre -0,7 e 2 ‰, sobrepondo-se ao valor de referência para as leguminosas. A abundância de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas é dependente de vários fatores: a fonte de N associada a planta, profundidade do solo na qual o N foi adsorvido (NARDOTO et al., 2008) e depende da forma do N usado pela planta (NH_4^+ , NO_3^- ou N-orgânico) (HOGBERG, 1997;

MARDEGAN et al., 2009). Nas folhas tem sido observado que geralmente ocorre um empobrecimento em ^{15}N em relação ao substrato de crescimento (HOGBERG, 1997), podendo explicar a baixa quantidade de ^{15}N encontrada na filosfera das duas espécies arbóreas. As diferenças em $\delta^{15}\text{N}$ encontradas entre *E. edulis* e *G. opposita*, tanto na dermosfera quanto na filosfera, poderia ser explicada pelo fato de que embora as duas espécies arbóreas se encontrem no mesmo habitat, elas estariam obtendo N de fontes diferentes (BUSTAMANTE et al., 2004).

Nas florestas tropicais, a quantidade de N é maior do que nas florestas temperadas, no entanto entre as florestas tropicais, aquelas com mais abundância N têm maior $\delta^{15}\text{N}$ do que as florestas tropicais limitantes em N (MARTINELLI et al., 1999).

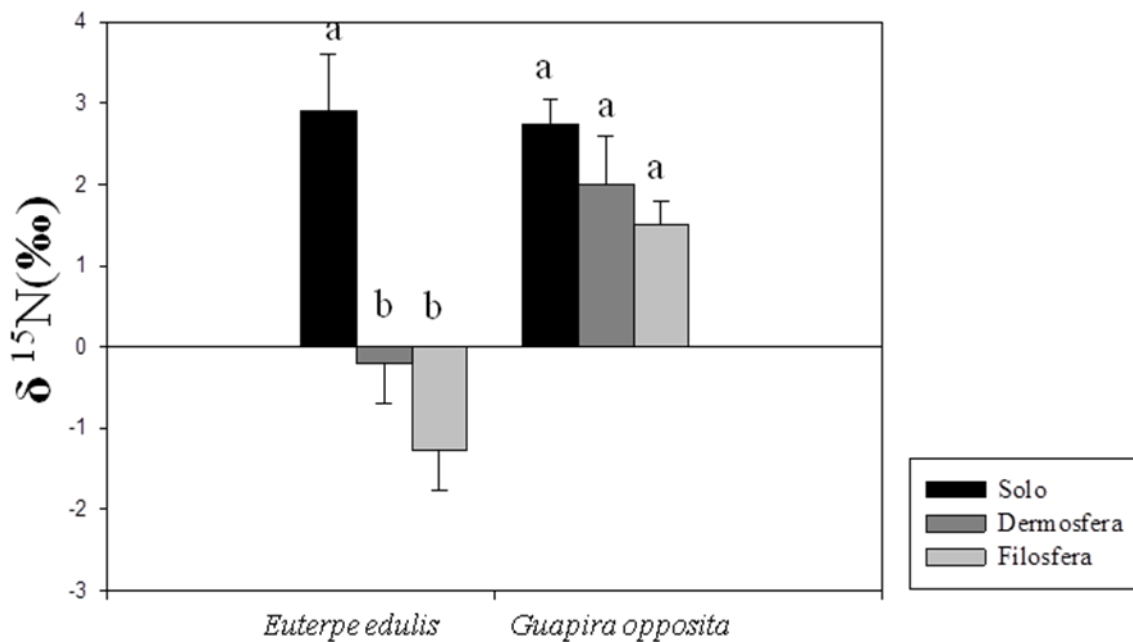


Figura 15 – Variação da abundância natural ($\delta^{15}\text{N}$), nos três compartimentos das árvores *E. edulis* e *G. opposita* na época de baixa pluviosidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

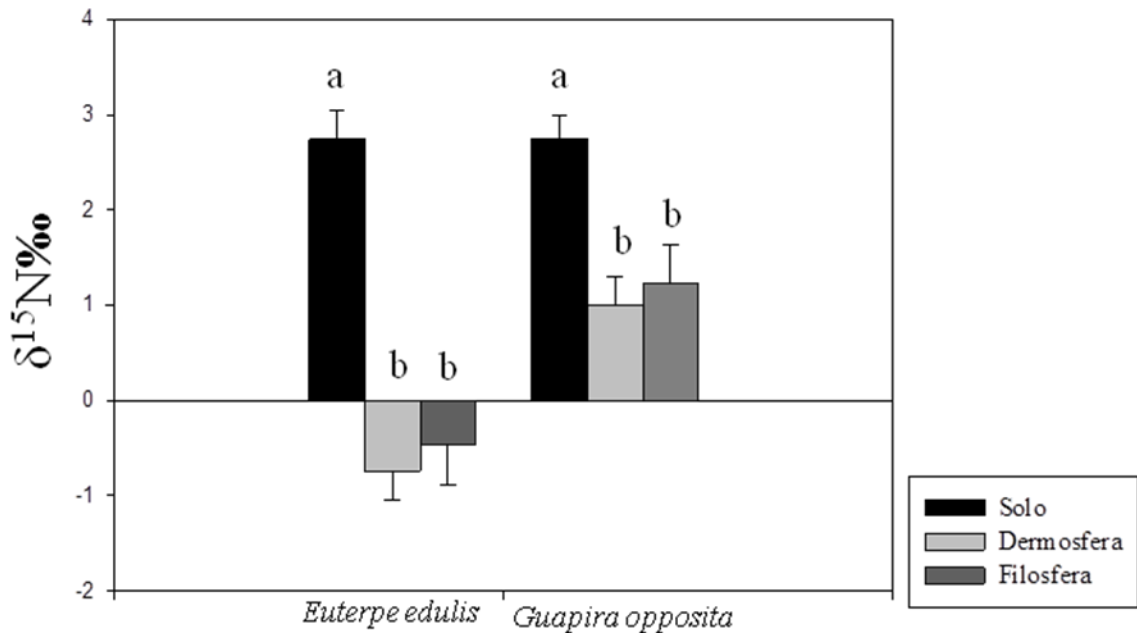


Figura 16 – Variação da abundância natural ($\delta^{15}\text{N}$), nos três compartimentos das árvores *E. edulis* e *G. opposita* na época de alta pluviosidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$)

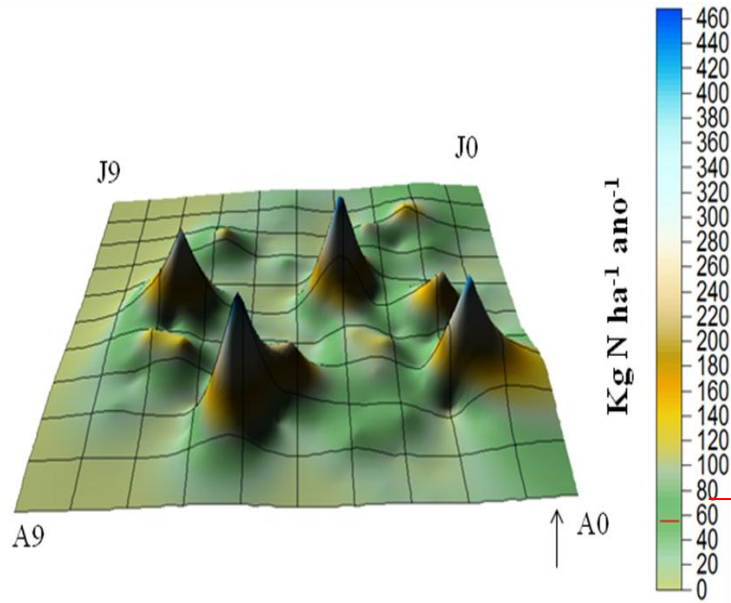
2.3.4 Variabilidade Espacial da FBN na Serapilheira e no Solo

A amostragem da serapilheira e do solo em grid permitiu a determinação da variabilidade espacial da FBN na parcela A da restinga. Os mapas mostram a variação da FBN no solo (Figura 17) e na serapilheira (Figura 17) na época de alta pluviosidade. Os picos azuis representam os valores maiores de fixação de N para cada compartimento. De maneira geral, foram observados mais picos na serapilheira do que no solo, sugerindo que sua variabilidade espacial é maior (Figura 17). Fazendo uma extrapolação para kg de N por hectare e por ano, no solo, o ponto de maior fixação atingiu $443,21 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N enquanto na serapilheira a maior fixação foi de $162,99 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N. Os valores meios de FBN foram $56,37 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e $18,71 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ respectivamente. Em alguns casos, as regiões com maior FBN no solo ou serapilheira são coincidentes com os locais de amostragem de árvores com altos níveis de FBN na filosfera ou dermosfera. Na filosfera e no solo de *E. edulis* ocorreu a maior FBN na época de baixa pluviosidade; enquanto em *G. opposita* a maior FBN ocorreu na dermosfera e filosfera na época de baixa pluviosidade e no solo e na dermosfera na época de alta pluviosidade. A taxa de FBN no solo sob a copa da árvore (Tabela 6), expressada em $\text{ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-2}$, foi maior que a FBN encontrada no solo do grid, isso deve-se possivelmente ao efeito da rizosfera da planta sob a atividade dos microrganismos diazotróficos.

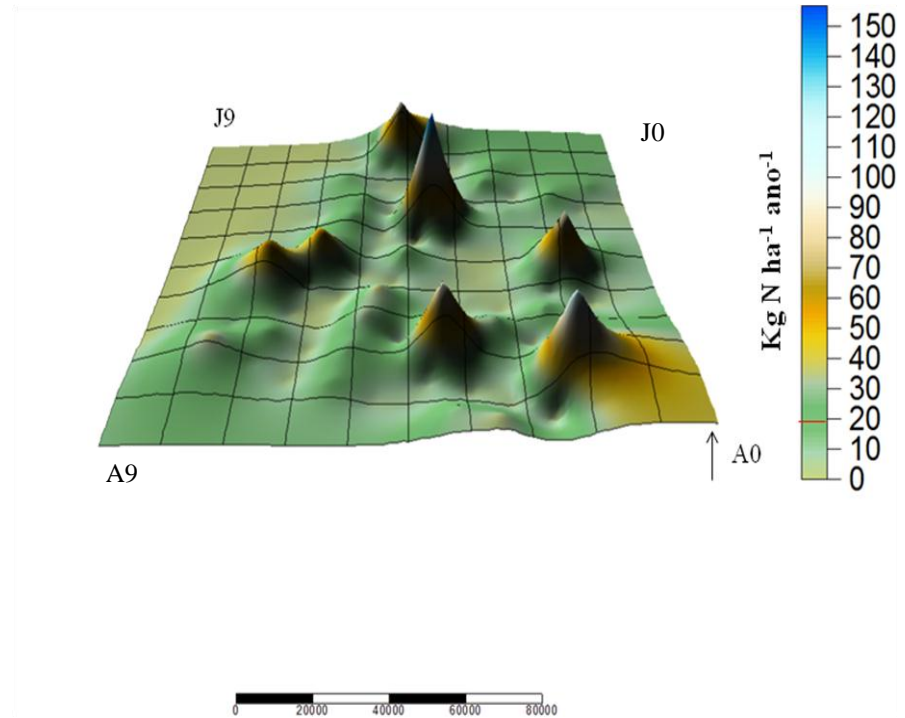
O conteúdo de água foi significativamente ($P < 0,001$) maior no solo ($59,61 \pm 2,8$) quando comparado com a serapilheira ($1,27 \pm 0,05$), mas não houve correlação entre umidade do solo ou a serapilheira e FBN, sugerindo que o conteúdo de água não é o fator mais importante para a fixação de N na parcela A da restinga.

Em outros trabalhos a umidade do solo relaciona-se com a maior atividade da nitrogenase devido à diminuição de concentração de oxigênio (HOFMOCKEL; SCHLESINGER, 2007). Nesse ambiente anóxico, a decomposição da serapilheira é mais lenta e se associada com a qualidade do material vegetal, rico em lignina e outros compostos recalcitrantes das espécies vegetais que se encontram na restinga, e a taxa de decomposição diminui (MARTINS, 2010). A atividade dos diazotróficos na FBN na serapilheira depende das taxas de decomposição do material orgânico associado às espécies arbóreas (REED et al., 2011).

N ↑



(A) Solo



(B) Serapilheira

Figura 17 - Distribuição espacial das estimativas das taxas de FBN no solo (A) na serapilheira (B) da parcela permanente de 1 ha de restinga. Os picos azuis representam os pontos mais altos da fixação de N. As setas indicam o início da parcela. Os símbolos A0 e J9 indicam o início e o final da parcela. As estimativas das taxas de FBN estão dadas em $\text{Kg ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$. A linha vermelha dentro da escala indica a média das estimativas das taxas de FBN em cada compartimento.

2.3.5 Análise da Diversidade de Bactérias na Filosfera, Dermosfera e Solo sob a Copa de *E. edulis* e *G. opposita*

Do pirosequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA, foram obtidas 229.680 sequências nos três compartimentos das duas espécies vegetais. Após o processamento foram obtidas 188.629 sequências válidas, de alta qualidade com um comprimento ≥ 175 bases em todas as amostras. A média do tamanho das sequências foi de 216 bases. As sequências válidas foram agrupadas em 16.727 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), considerando-se 97% de similaridade entre as sequências.

2.3.5.1 Estimativa de Riqueza e Diversidade

O número de sequências por amostra variou entre 21.686 (dermosfera de *G. opposita*) e 38.532 (solo de *E. edulis*) (Tabela 10). O número de UTOs variou entre 3.131 (filosfera de *G. opposita*) e 5.501 (dermosfera de *E. edulis*). Esta grande quantidade de sequências obtidas permitiu uma elevada cobertura de amostragem da comunidade bacteriana (>88%) (Tabela 10), embora o platô não fosse alcançado. As curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs em função do esforço de sequenciamento podem ser observadas na figura 18.

Os estimadores não paramétricos Chao1 e ACE indicaram que em *E. edulis* a maior riqueza de UTOs ocorreu na dermosfera, seguida pelo solo e filosfera (Tabela 10). Em *G. opposita*, a maior riqueza de UTOs foi observada na dermosfera e solo, diferindo da riqueza de UTOs estimada da filosfera, com base no intervalo de confiança (95% de confiança) (Tabela 10).

Tanto para *E. edulis* quanto para *G. opposita*, o maior valor do índice de Shannon foi observado na dermosfera (Tabela 10), o valor mais alto do recíproco de Simpson foi observado no solo sob a copa de *E. edulis* e na dermosfera de *G. opposita*. Com base no índice de Shannon e recíproco do índice de Simpson, a dermosfera de *G. opposita* apresentou a maior diversidade entre os compartimentos amostrados. Diferenças significativas na estimativa da diversidade entre os diferentes compartimentos de *G. opposita* foram observadas pelo índice de Shannon (Tabela 10). Porém, segundo o recíproco de Simpson, a diversidade na dermosfera e no solo foram significativamente maiores do que na filosfera (Tabela 10). Em *E. edulis* houve diferenças significativas para os índices de Shannon e o recíproco de Simpson entre todos os compartimentos (Tabela 10). O valor do índice de Shannon ficou por acima de três indicando em todas as amostras alta diversidade (CLARKE;

WARWICK, 2001). A maior diversidade microbiana observada na dermosfera possivelmente deve-se a presença de organismos associados neste compartimento como musgos, briófitos líquens e algas e às condições ambientais características desse ambiente, por exemplo, umidade e partículas de solo (BRAGINA et al., 2012).

Em *E. edulis*, a dermosfera foi o ambiente com maior riqueza e diversidade segundo os índices avaliados, já no caso de *G. opposita* o solo sob a copa da árvore mostrou a maior riqueza mas foi menos diverso do que a dermosfera (Tabela 10).

A distribuição dos UTOs entre os compartimentos é mostrada nos diagramas de Venn (Anexo B e C). É possível observar nas duas espécies arbóreas, que os três compartimentos compartilham UTOs, sendo o maior número em *G. opposita* (277 UTOs) quando comparado com *E. edulis* (223 UTOs). Foram observados mais UTOs comuns entre dermosfera e filosfera, do que entre dermosfera e solo ou filosfera e solo, nas duas espécies vegetais (Anexo B). Em *E. edulis*, o maior número de UTOs únicas ocorreu na dermosfera (4385), seguida do solo (3730) e da filosfera (2382) (Anexo B). Já, em *G. opposita*, 2138 UTOs únicas foram observados na dermosfera, 2026 na filosfera e 3003 no solo (Anexo C).

Quando comparados os mesmos compartimentos entre as duas espécies vegetais, é possível observar o compartilhamento de 1032 UTOs na dermosfera, 1196 UTOs na filosfera e 1590 UTOs no solo (Anexo D). Nos três compartimentos de *E. edulis* foram observados mais UTOs quando comparados com *G. opposita*.

As comparações das comunidades bacterianas com base nas sequências do gene rRNA 16S usando o programa LIBSUFF (MOTHUR), mostram que as comunidades de Bacteria nos compartimentos estudados são estatisticamente diferentes ($P < 0,01$). Esses dados sugerem que a espécie vegetal poderia estar selecionando grupos bacterianos específicos na filosfera dermosfera e solo sob a copa das árvores.

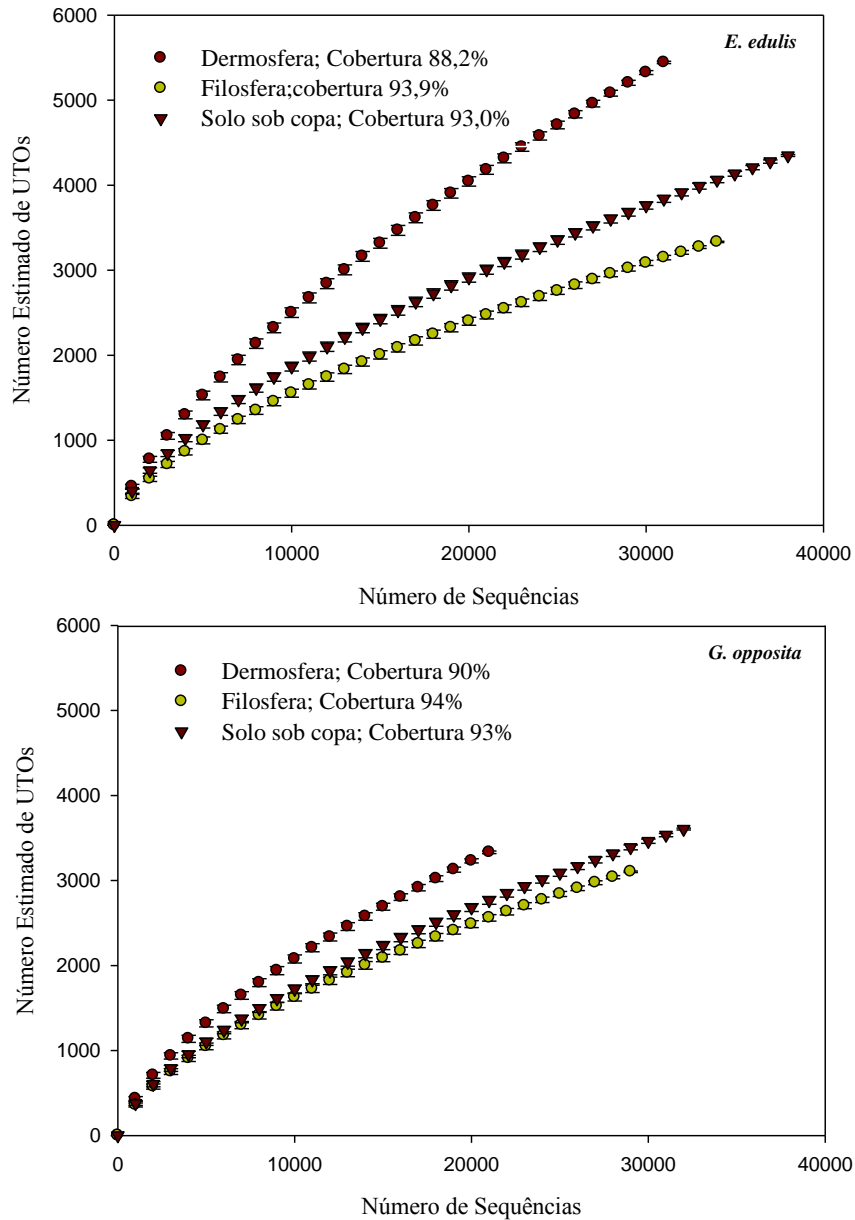


Figura 18 - Curvas de rarefação indicando o número estimado de UTOs na filofera, dermosfera e solo sob a copa da árvore das espécies vegetais *E. edulis* e *G. opposita* em função do esforço de sequenciamento.

Tabela 10 - Estimativa da riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais, índices de diversidade e cobertura de amostragem, determinados com base no pirosequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S de Bactéria, da filosfera, dermosfera e solo sob a copa da árvore de cada espécie vegetal.

Espécie vegetal	Compartimento	Estimativa da Riqueza				Índices de Diversidade		
		NS ^a	NU ^b	ACE ^c	CHAO ^c	1/D ^d	Shannon ^d	ICE ^e
<i>E. edulis</i>	Dermosfera	31486	5501	28149,66(27256,46;29079,54)a	15555,11(14591,34; 16621,07)a	59,015(57,39; 60,74)c	6,10(6,07; 6,13)a	0,88
	Filosfera	34204	3345	14132,91(13575,73;14720,45)c	8121,37(7538,35; 8785,44)c	64,63(63,06; 66,29)b	5,54(5,52; 5,56)c	0,94
	Solo sob copa	38532	4386	16806,67(16206,45;17437,36)b	10281,57(9653,73; 10984,22)b	75,62(73,53; 77,84)a	5,95(5,93; 5,97)b	0,93
<i>G. opposita</i>	Dermosfera	21686	3400	14281,86(13715,80;14878,98)a	8752,54(8100,49; 9495,02)a	78,73(75,62; 82,09)a	6,05(6,02; 6,09)a	0,90
	Filosfera	29451	3131	11178,73(10719,50;11665,73)b	6923,96(6449,42; 7466,37)b	66,92(65,07; 68,87)b	5,64(5,61; 5,66)c	0,94
	Solo sob copa	32479	3639	15274,58(14680,40;15900,73)a	9247,38(8585,87; 9997,36)a	73,70(71,64; 75,88)a	5,79(5,77; 5,82)b	0,93

^aNúmero de sequências válidas analisadas por biblioteca, ^bNúmero de Unidades Taxonômicas Operacionais ($\geq 97\%$ similaridade).

^cEstimadores não paramétricos de riqueza de espécies: ACE, CHAO, ^dÍndices de diversidade: Recíproco de Simpson (1/D) e Shannon, Estimador de máxima semelhança.

^eÍndice de cobertura estimada. Valores entre parêntesis representam intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Letras iguais dentro da mesma coluna indica que não existem diferenças significativas.

2.3.5.2 Análise Taxonômica das Comunidades Bacterianas no Solo Rizosférico, Dermosfera e Filosfera de *E. edulis* e *G. opposita*

A frequência relativa dos filos do domínio Bacteria nos diferentes compartimentos de *E. edulis* e *G. opposita* está representada na figura 19. O filo Proteobacteria foi o mais abundante no solo (*E. edulis*: 30,35%, *G. opposita*: 30,80%) (Figura 19), Todas as UTOs classificadas como Proteobacteria foram afiliadas às classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria (Figura 20). A classe Alphaproteobacteria (*E. edulis*: 43,94%, *G. opposita*: 60,90%) foi a mais abundante no solo. Essa classe caracteriza-se por ser muito diversa devido à presença de diversos grupos microbianos que desenvolvem diferentes funções biológicas (BATUT; ANDERSSON; CALAGHAN, 2004). Além disso, foi reportado que sua abundância estaria relacionada com a quantidade de matéria orgânica existente nas camadas superiores do solo (AXELROOD et al., 2002).

A segunda classe mais abundante foi Gammaproteobacteria (*E. edulis*: 27,37%, *G. opposita*: 22,62%). UTOs afiliadas às classes Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria foram detectadas em menor frequência. Em *E. edulis* 15,68%, das UTOs do solo foram filiadas a Deltaproteobacteria. Já em *G. opposita*, 10,33% das UTOs foram afiliadas a Deltaproteobacteria. Em *E. edulis* 12,35% e em *G. opposita*, 4,82% das UTOs foram afiliadas a Betaproteobacterias no solo.

O segundo filo mais abundante no solo foi Acidobacteria, com UTOs afiliadas a 16 subgrupos, sendo os subgrupos Gp1, Gp2 e Gp3 os mais abundantes. A abundância do filo Acidobacteria no solo sob a copa de *E. edulis* (20,22%) foi menor do que em *G. opposita* (21,74%). Lima (2011) observou que Acidobacteria foi o filo mais abundante no solo, seguido do filo Proteobacteria, mas as amostras de solo não foram coletadas sobre a projeção da copa das árvores. A dominância das Acidobacterias no solo pode ser explicada por sua habilidade em degradar celulose e outros compostos encontrados nas florestas (WARD et al., 2009), associado a sua habilidade em crescer em ambientes alagados e com pH baixo (JONES et al., 2009; BRUCE et al., 2010), característico dos ecossistemas de restinga. A alta abundância dos subgrupos Gp1, Gp2 e Gp3 no solo sugere que essas bactérias poderiam desenvolver funções importantes nos processos microbianos desse ambiente (BRUCE et al., 2010) devido às condições oligotróficas e de pH baixo (JONES et al., 2009).

Os filos Proteobacteria e Acidobacteria, já foram reportados em solos da Mata Atlântica como os filos mais abundantes (LIMA, 2011; BRUCE et al., 2010; ANDRADE,

2007, JANSSEN, 2006), mostrando uma distribuição muito ampla. Esses dois grupos também foram os mais representativos no solo da Restinga de Ubatuba, da floresta ombrófila densa das terras baixas e montana (LIMA, 2011; ROMAGNOLI, 2011), sugerindo que são os grupos dominantes entre os diferentes tipos de bactérias do solo da Mata Atlântica. A alta incidência de Proteobactérias no solo também tem sido reportada em trabalhos similares usando o pirosequenciamento (NACKE et al., 2011).

Junto com os filos Proteobacteria e Acidobacteria, os filos Actinobacteria, Verrumicrobia, Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes e Firmicutes têm sido considerados dominantes nos solos. No entanto, Planctomycetes, Bacteroidetes e Firmicutes são reportados como menos abundantes (JANSSEN, 2006, BRUCE et al., 2010). O filo Clamydiae foi detectado no solo, representando 9,34% e 9,31% em *E. edulis* e *G. opposita* respectivamente (Figura 19). Esse filo também foi reportado por Lima (2011) e Romagnoli, (2011).

Bactérias do filo Proteobacteria foram as mais abundantes na dermosfera das duas espécies arbóreas (*E. edulis* 38,99% e *G. opposita* 44,64%) (Figura 19). As cinco classes de Proteobacteria ocorreram nesse ambiente, mas as classes Alphaproteobacteria (*E. edulis* 37,00% e *G. opposita* 59,06%) e Gammaproteobacteria (*E. edulis* 37,07% e *G. opposita* 24,75%) foram as mais abundantes. As Alphaproteobacteria têm sido reportadas anteriormente como dominantes quando associadas com líquens em diferentes substratos como rochas (BATES et al., 2009), solo (GRUBE et al., 2009), e dermosfera (ANDRADE, 2007).

O segundo filo mais abundante na dermosfera foi Acidobacteria representando 9,88% das UTOs de *E. edulis* e 11,13% das UTOs de *G. opposita*, seguido de Verrumicrobia (*E. edulis* 9,32% e *G. opposita* 8,57%), Planctomycetes (*E. edulis* 8,04% e *G. opposita* 7,83%), Bacteroidetes (*E. edulis* 7,73% e *G. opposita* 5,09%), Cyanobacteria (*E. edulis* 4,97% e *G. opposita* 4,92%), Firmicutes (*E. edulis* 4,48% e *G. opposita* 4,83%), Actinobacteria (*E. edulis* 4,59% e *G. opposita* 4,48%) e Gemmatimonadetes (*E. edulis* 3,58% e *G. opposita* 1,56%) (Figura 19).

Observou-se que a distribuição dos filos na dermosfera é mais similar a de filosfera com a filosfera do que do solo nas duas espécies arbóreas estudadas. Os filos Cyanobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, foram mais abundantes nesses dois ambientes do que no solo (Figura 19). Os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Acidobacteria encontram-se associados aos líquens e briófitas (BATES et al., 2009; GRUBE et al., 2009), que por sua vez

estão associados às espécies arbóreas. Embora o grupo Cyanobacteria fosse mais abundante na dermosfera e na filosfera do que no solo, ele é menos abundante em relação a grupos como Alphaproteobactéria, Gammaproteobacteria e Acidobacteria. É muito provável que bactérias heterotróficas potencialmente fixadoras de N₂ representem uma parte importante da comunidade microbiana desses ambientes (FURNKRANZ et al., 2008).

Assim como nos demais compartimentos, o filo Proteobacteria foi o mais abundante também na filosfera representando 47,91%, e 44,01% das UTOs de *E. edulis* e *G. opposita*, respectivamente. UTOs representando as classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Epsilonproteobacteria foram detectados na filosfera (Tabela 11), mas as classes Alphaproteobacteria (*E. edulis* 57,94%, *G. opposita* 42,27%) e Gammaproteobacteria (*E. edulis* 26,91%, *G. opposita* 34,44%) foram mais abundantes que os outros grupos (Tabela 11).

O grupo Alphaproteobacteria tem sido reportado como o grupo mais abundante na filosfera de outras espécies vegetais (FURNKRANZ et al., 2008; JACKSON; DENNEY, 2011; KIM et al., 2012), concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Comparando as filosfera das duas espécies arbóreas, UTOs de bactérias associadas a *E. edulis* mostraram alta similaridade com as Alphaproteobacteria, enquanto as Gammaproteobacteria, embora sua abundância tenha sido mais baixa do que a de Alphaproteobacteria, foram mais abundantes na filosfera de *G. opposita* quando comparado com *E. edulis* (Tabela 11).

Bacteroidetes (*E. edulis* 7,17%, *G. opposita* 9,66%) foi o segundo filo mais abundante na filosfera, seguido dos filios Actinobacteria (*E. edulis* 5,54%, *G. opposita* 5,78%), e Cyanobacteria (*E. edulis* 3,85%, *G. opposita* 3,24%) (Figura 19). Os filios Bacteroidetes e Actinobacteria, foram mais abundantes na filosfera de *G. opposita* do que na filosfera de *E. edulis*. (Figura 19). A presença na filosfera do filo Acidobacteria, foi maior do que reportado em outros trabalhos (RUIZ, 2010; ANDRADE, 2007). Por outro lado, Firmicutes (*E. edulis* 5,57%, *G. opposita* 6,97%), Planctomycetes (*E. edulis* 6,59%, *G. opposita* 5,49%) e Verrucomicrobia (*E. edulis* 8,07%, *G. opposita* 7,45%) encontraram-se quase na mesma proporção do que no solo.

Os filios Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes têm sido reportados na filosfera de diferentes espécies arbóreas (REDFORD et al., 2010; ANDRADE, 2007). Diferentes fatores além dos climáticos poderiam afetar a colonização das bactérias na filosfera, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes fornecidos pela planta (fontes de C) ou a liberação de compostos voláteis, pH, salinidade incidência de UV entre outros (REDFORD et al., 2010).

A diversidade do filo Proteobacteria em todos os compartimentos e em ambientes diferentes deve-se principalmente a forma de vida, à significância ecológica, habilidade para mudar de forma e capacidade metabólica. Dentro desse grupo, a diversidade das Alphaproteobacteria destaca-se em diferentes ambientes devido a suas formas de vida (rápida adaptação ao habitat), ao tamanho do genoma e a sua distribuição geográfica (ETTEMA; ANDERSSON, 2009).

A abundância do filo Acidobacteria no solo sob a copa de *E. edulis* e *G. opposita* (*E. edulis* 20,22%, *G. opposita* 21,74%) foi maior do que nos outros compartimentos, por exemplo. O filo Chlamydiae foi detectado no solo em maior frequência do que na filosfera e na dermosfera das duas espécies arbóreas. Sequências representando os filos Verrumicrobia, Planctomycetes, Firmicutes e Bacteroidetes, também foram detectadas nos três compartimentos. Os filos Planctomycetes, Chlamydiae e Verrumicrobia formam o superfilo PVC, têm estilos de vida muito diferentes, são patógenos de humanos e formam simbiose com organismos eucariotos, além de serem encontrados nos ambientes aqui avaliados, são importantes no ciclo do N marinho (WAGNER; HORN, 2006). No filo Bacteroidetes existem alguns membros de metabolismo aeróbio, anaeróbio e anaeróbio facultativo, razão pela qual a composição de espécies depende dos níveis de O₂ no solo (JANSSEN, 2006).

O filo Chloroflexi foi mais abundante na dermosfera de *E. edulis* (2,18%), quando comparado com os outros compartimentos da mesma planta e esse mesmo compartimento em *G. opposita*.



Figura 19 - Frequência relativa dos filos do domínio Bacteria representando as UTOs em cada compartimento para *E. edulis* e *G. opposita*. S=solo, D=dermosfera, F=filosfera. Os números dentro das barras significam o número de UTOs por filotipo (≥97% similaridade).

Tabela 11 – Número de UTOs ao nível de Classe dentro do filo Proteobacteria para cada compartimento nas espécies *E. edulis* e *G. opposita*. S=solo, D=dermosfera, F=filosfera. Os números dentro das barras significam o número de UTOs por classe ($\geq 97\%$ similaridade).

	SOLO		DERMOSFERA		FILOSFERA	
	<i>E. edulis</i>	<i>G. opposita</i>	<i>E. edulis</i>	<i>G. opposita</i>	<i>E. edulis</i>	<i>G. opposita</i>
Alphaproteobacteria	939	961	488	890	788	470
Betaproteobacteria	264	76	122	81	63	99
Deltaproteobacteria	335	163	214	158	139	156
Epsilonproteobacteria	14	21	6	5	4	4
Gammaproteobacteria	585	357	489	373	366	383
Total de UTOs	2137	1578	1319	1507	1360	1112

2.3.5.3 Diversidade de possíveis Diazotróficos de Vida-Livre no Solo Rizosférico, Dermosfera e Filosfera de *E. edulis* e *G. opposita*

O objetivo desta análise foi verificar a frequência de grupos no nível de gênero, de diazotróficos potenciais encontrados na filofera, dermosfera e solo rizosférico, nas duas espécies vegetais (Tabela 12). O filo Proteobacteria foi mais abundante nos três compartimentos e dentro desse filo, diazotróficos potenciais dos grupos Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram mais abundantes.

No solo, os possíveis diazotróficos da classe Alphaproteobacteria foram mais abundantes do que as Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria. Entre as Alphaproteobacteria, os gêneros mais abundantes *Rhodopila*, *Beijerinckia* e *Methylovirgula* (Figura 20) caracterizam-se por ter espécies diazotróficas (LASKAR; SHARMA; DEB, 2010). Enquanto entre as Gammaproteobacteria, os mais abundantes foram os gêneros *Methylococcus*, *Pseudomonas* e *Beggiatoa* (Figura 22). O gênero *Methylococcus*, é metanotrófica e que precisa de condições microaerófilas para fixar N_2 (MURREL; DALTON, 1983), Já entre as Betaproteobacterias, os gêneros *Derxia*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum* foram os gêneros mais abundantes. *Derxia* e *Beijerinckia* são dois gêneros potencialmente importantes na FBN por colonizar solos em condições de alta de umidade (LASKAR; SHARMA; DEB, 2010). *Beijerinckia* é encontrada frequentemente nos solos das florestas tropicais e devido a sua característica heterotrófica ele usa como substrato diferentes compostos de carbono, além de fixar o N_2 em condições microaerófilas ou aeróbicas (LASKAR; SHARMA; DEB, 2010). O filo Firmicutes foi mais abundante no solo, com dominância dos gêneros *Paenibacillus* e *Clostridium* Este último foi mais abundante no solo e esteve quase ausente nos outros compartimentos. *Clostridium* é um diazotrófico característico de ambientes marinhos e um anaeróbio obrigatório que ocorre em solos alagados (CAPONE, 1988). O filo Chlorobi foi mais abundante no solo de *G. opposita* (Anexo E).

Na dermosfera de *E. edulis*, a classe Gammaproteobacteria foi mais abundante enquanto em *G. opposita* foi a classe Alphaproteobacteria. As Gammaproteobacteria com maior ocorrência pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Azorhizophilus*, *Azomonas* e *Methylococcus* (Figura 22). Em *G. opposita* o gênero *Beggiatoa* foi mais abundante do que em *E. edulis* (Figura 22). Entre as Alphaproteobacteria dominaram os gêneros *Rhodophila*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Methylovirgula* e *Beijerinckia* (Figura 20). Os gêneros *Rhodophila*, *Beijerinckia* e *Methylocystis* têm sido reportados associados a briófitas do gênero *Sphagnum* realizando FBN (BRAGINA et al., 2012). Já entre as Betaproteobacteria, os gêneros mais abundantes foram *Derxia* e *Burkholderia*. Os gêneros *Alcaligenes*, *Azohydromonas*, *Pelomonas*, *Variovorax* e *Rhodocyclus* foram detectados somente na dermosfera de *E. edulis* (Figura 21).

A presença do filo Cianobacteria foi maior na dermosfera do que na filosfera (Figura 23). Nesse compartimento, além de cianobactérias, a abundância das Gammaproteobacteria fixadoras potenciais de N₂ em *E. edulis* foi alta.

Na filosfera das duas espécies arbóreas, as Alphaproteobacteria potenciais diazotróficas foram mais abundantes em *E. edulis* do que em *G. opposita* (71,8 % e 70,2 % respectivamente); e mais abundantes do que as Gammaproteobacterias (22,9 % e 24,9 % respectivamente). Os gêneros dominantes das Alphaproteobacteria foram *Rhodophila*, *Sphingomonas*, *Rhodospirillum*, e *Beijerinckia*, *Methylovirgula* foi mais abundante em *G. opposita* (Figura 20). Das Gammaproteobacterias a maior dominância está nos gêneros *Pseudomonas*, *Methylococcus*, *Azomonas*, *Beggiatoa*, *Azorhizophilus* e *Klebsiella* (Figura 22). Este último foi mais abundante na filosfera das duas espécies vegetais quando comparado com os demais compartimentos. Entre as Alphaproteobacteria, os gêneros *Phaeospirillum* e *Azospirillum* foram reportados só na filosfera das duas espécies arbóreas (Figura 20). Entre as Betaproteobacterias, *Derxia* e *Burkholderia*, foram os grupos dominantes, *Pelomonas* se apresentou na filosfera de *E. edulis* e *Azohidromonas* e *Herbaspirillum* na filosfera de *G. opposita* (Tabela 12).

O gênero *Ancylobacter* (Alphaproteobacteria) encontrou-se na filosfera e dermosfera de *G. opposita* (Tabela 12), enquanto *Rhodobium* (Alphaproteobacteria) foi reportado na filosfera e dermosfera de *E. edulis* e no solo rizosférico das duas espécies arbóreas (Figura 20). As *Sphingomonas* caracterizam-se por serem aeróbicas, não patogênicas e abundantes na filosfera devido à produção de pigmentos (BUSSE et al., 2003) que ajudam na adaptação das bactérias que colonizam a filosfera para se proteger da radiação UV (FOKKEMA; SCHIPPERS, 1986). *Rhodophila* é uma Alphaproteobacteria fotoheterotrófica que cresce em

lugares com maior incidência de luz, o que explicaria sua maior abundância na parte aérea da planta (Figura 20). O gênero *Beggiatoa* (Gammaproteobacteria) é característico dos ambientes marinhos e ambientes que estão em influência direta do mar (SCHMIDT et al., 1987). O seu crescimento em ambientes altamente oxigênicos é muito limitado (SCHMIDT et al., 1987).

Ao nível de compartimento, a abundância estimada dos diazotróficos potenciais de vida livre do filo Proteobacteria, foi maior na Dermosfera e nas folhas.

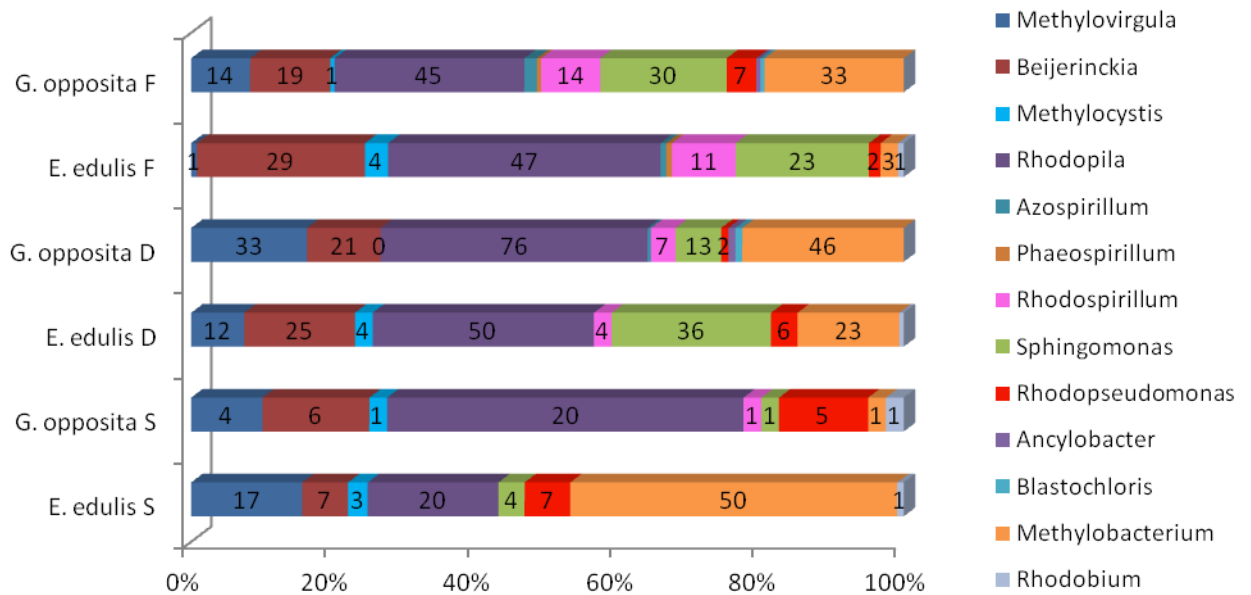


Figura 20 - Distribuição taxonômica ao nível de gênero de possíveis bactérias diazotróficas afiliadas à classe Alphaproteobacteria. F=Filosfera, D=Dermosfera, S=Solo sob a copa da árvore.

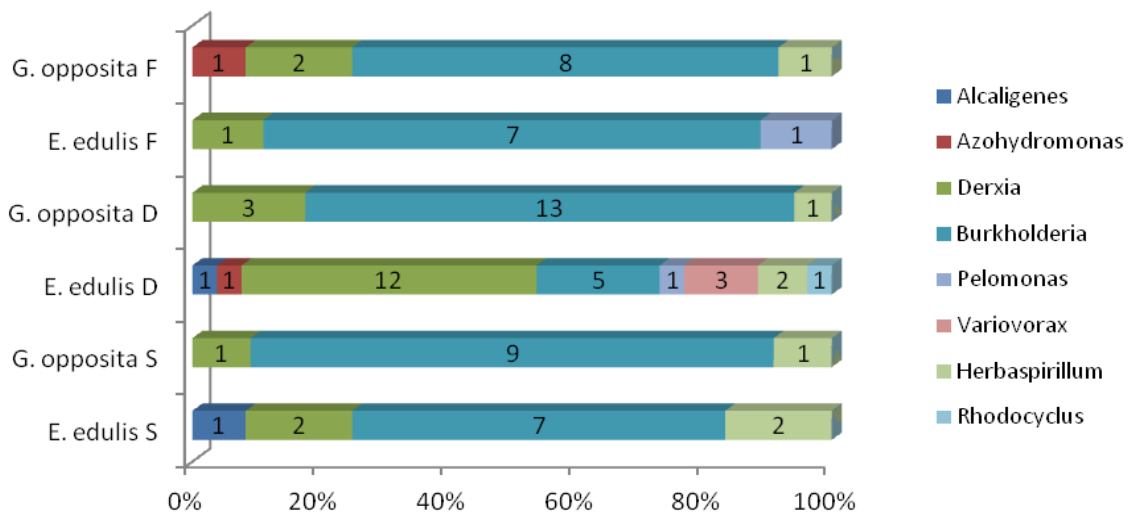


Figura 21 - Distribuição taxonômica ao nível de gênero de possíveis bactérias diazotróficas afiliadas à classe Betaproteobacteria. F=Filosfera, D=Dermosfera, S=Solo sob a copa da árvore.

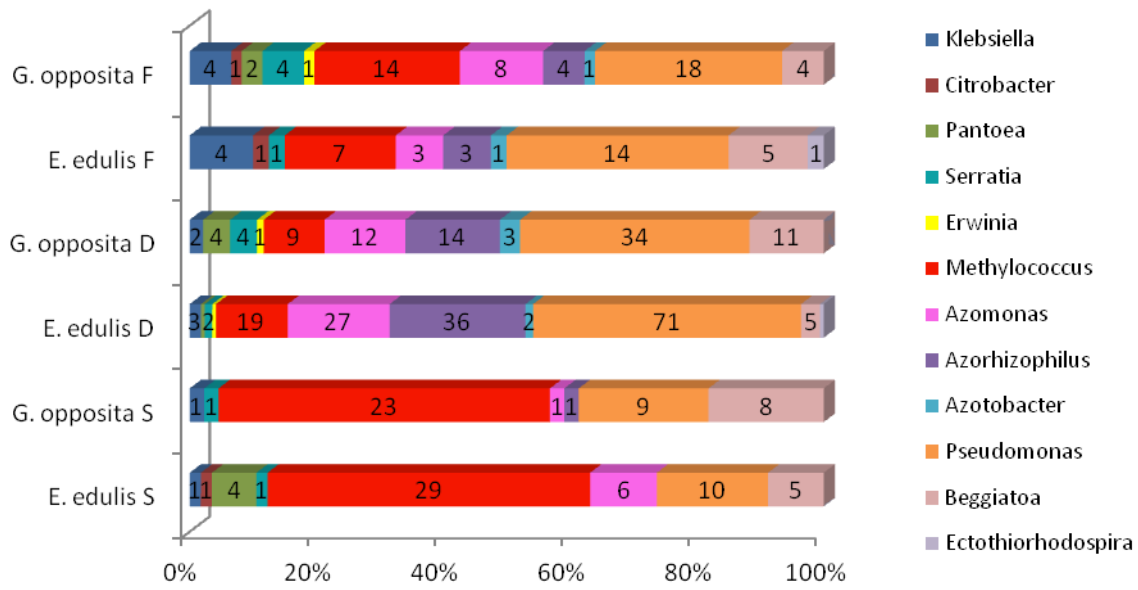


Figura 22 - Distribuição taxonômica ao nível de gênero de possíveis bactérias diazotróficas afiliadas à classe Gammaproteobacteria. F=Filosfera, D=Dermosfera, S=Solo sob a copa da árvore.

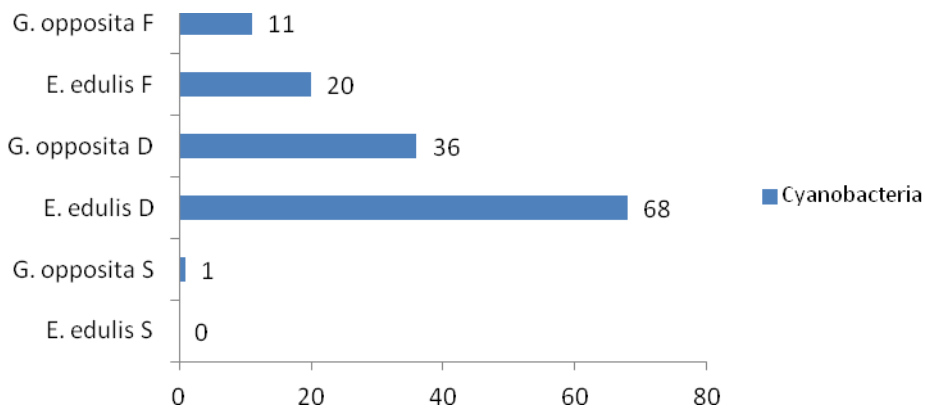


Figura 23 Distribuição taxonômica dos grupos detectados no filo Cyanobacteria. F=Filosfera, D=Dermosfera, S=Solo sob a copa da árvore.

Tabela 12 – Gêneros de diazotróficos potenciais de vida-livre encontrados nas espécies vegetais avaliadas.

	Presença nos compartimentos	Espécie vegetal
Proteobacteria		
Alphaproteobacteria		
<i>Methylovirgula</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Beijerinckia</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Methylocystis</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i>
<i>Rhodopila</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Azospirillum</i>	filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Phaeospirillum</i>	filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Rhodospirillum</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Sphingomonas</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Rhodopseudomonas</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Ancylobacter</i>	Dermosfera e filosfera	<i>G. opposita</i>
<i>Blastochloris</i>	Dermosfera solo	<i>E. edulis</i>
<i>Methylobacterium</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Rhodobium</i>	Solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
Betaproteobacteria		
<i>Alcaligenes</i>	Dermosfera e solo	<i>E. edulis</i>
<i>Azohydromonas</i>	Dermosfera e filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Derxia</i>	Dermosfera	<i>E. edulis</i>
<i>Burkholderia</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Pelomonas</i>	Dermosfera e filosfera	<i>E. edulis</i>
<i>Variovorax</i>	Dermosfera	<i>G. opposita</i>
<i>Herbaspirillum</i>	Dermosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Rhodocyclus</i>	Dermosfera	<i>E. edulis</i>
Gammaproteobacteria		
<i>Klebsiella</i>	Dermosfera e filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Citrobacter</i>	Filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Pantoea</i>	Dermosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Serratia</i>	Dermosfera e filosfera	<i>G. opposita</i>
<i>Erwinia</i>	Dermosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Methylococcus</i>	Solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Azomonas</i>	Dermosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Azorhizophilus</i>	Dermosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Azotobacter</i>	Dermosfera e Filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Pseudomonas</i>	Filosfera	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Beggiatoa</i>	Dermosfera, filosfera e solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	Dermosfera e filosfera	<i>E. edulis</i>

Tabela 12 – Gêneros de diazotróficos potenciais de vida-livre encontrados nas espécies vegetais avaliadas

.....(Conclusão)

Firmicutes		
<i>Paenibacillus</i>	Dermosfera e Solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
<i>Clostridium</i>	Solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>
Chlorobi		
<i>Prosthecochloris</i>	Filosfera, Solo	<i>E. edulis</i> e <i>G. opposita</i>

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FBN associada principalmente a dermosfera pode ser um dos principais aportes de entrada de N na floresta de restinga. A maior FBN encontrada na dermosfera de *E. edulis* poderia indicar que essa árvore estaria contribuindo mais nessa fixação de N.

As variáveis ambientais ARA, %N e %C explicaram em cada ambiente a discriminação das espécies arbóreas estudadas. A ARA foi o maior responsável pela discriminação, assim é possível de planta tenham papel fundamental para o aporte de N na restinga.

De uma maneira geral, a FBN na serapilheira e solo apresenta grande variabilidade espacial na restinga e pode estar associada à presença de grupos de diazotróficos específicos.

Foi observado que, entre os possíveis diazotróficos, o filo Proteobacteria é o grupo dominante nos três compartimentos avaliados, embora as condições ambientais em cada um dos ambientes seja diferente. E entre as Proteobacteria, a classe Alphaproteobacteria foi dominante na maioria dos compartimentos. *Rhodophila*, *Beijerinckia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* e *Methylovirgula* foram os gêneros mais abundantes nos três compartimentos. Entre as Gammaproteobacteria foram os gêneros *Methylococcus*, *Pseudomonas* e *Beggiatoa* os mais abundantes e entre as Betaproteobacteria foram *Derxia* e *Burkholderia*. A presença de cianobactérias na filosfera e na dermosfera foi baixa, indicando que outros gêneros de bactérias diazotróficas também podem contribuir com a FBN na restinga.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, M.P.M.; SCHMIDT, G.; STEWART, G.R.; JOLY, C.A. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell and Environmental**, Logan, v. 26, p. 389-399, 2003.
- ANDRADE, M.R. **Diversidade e biogeografia de filosfera, Dermosfera e solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 126 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ASSIS, M.A.; PRATA, E.; PEDRONI, P.; SANCHEZ, M.; EISENLOHR, P.V.; MARTINS, F.R.; DOS SANTOS, F.A.; TAMASHIRO, J.Y.; ALVES, L.; VIEIRA, S.A.; PICCOLO, M.C.; MARTINS, S.; CAMARGO, P.B.; CARMO, J.B.; SIMÕES, E.; MARTINELLI, L.A.; JOLY, C.A. Florestas de restinga e de terras baixas na planície costeira do sudeste do Brasil: vegetação e heterogeneidade ambiental. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-121, 2011.
- AXELROOD, P.E.; CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia Forest soils subjected to disturbance. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 655-675, 2002.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 69, p. 116-122, 1997.
- BARRON, A.R.; PURVES, D.W.; HEDIN, L.O. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. **Oecologia**, Marburg, v. 165, p. 511–520, 2011.
- BARRON, A.R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; WRIGHT, S.J.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum limitation of symbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 42-45, 2009.
- BATES, S.T.; CROPSEY, G.W.G.; CAPORASO, J.G. KNIGHT, R.; FIERER, N. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 4, p. 1309-1314, 2011.
- BATUT, J.; ANDERSSON, S.G.; O’CALLAGHAN, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 933-945, 2004.
- BECKER, V.E. Nitrogen fixing lichens in forest of the Southern Appalachian Mountains of North Carolina. **The Bryologist**, Boston, v. 83, n. 1, p. 29-39, 1980.

BELLENGER, J.P.; WICHARD, T.; XU, Y.; KRAEPIEL, A.M.L. Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂ bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 1395-1411, 2011.

BENNER, J.W.; CONROY, S.; LUNCH, C.; TOYODA, N.; VITOUSEK, P. Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the Cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian Montane Forests. **Biotropica**, Malden, v. 39, n. 3, p. 400–405, 2007.

BENTLEY, B.L. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St Louis, v. 74, p. 234-241, 1987.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.B. KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKY, P. Segregation of Nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine Cyanobacterium *Trichodesmium*, **Science**, Washington, v. 294, 1534-1539, 2001.

BERNHARD, A. The nitrogen cycle: processes, players, and human impact. **Nature Education Knowledge**, London, v. 2, n. 2, p. 12, 2010.

BHATIA, R.; RUPPEL, S.; NARULA, N. *NifH*-based studies on azotobacterial diversity in cotton soils of India. **Archives of Microbiology**, Paris, v. 191, p. 807-813, 2009.

BRAGINA, A.; MAIER, S.; BERG, C.; MÜLLER, H.; CHOBOT, V.; HADACEK, F.; BERG, G. Similar diversity of Alphaproteobacteria and nitrogenase gene amplicons on two related *Sphagnum* mosses. **Terrestrial Microbiology**, Aberdeen, v. 2, p. 1-10, 2012.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; NETO, O.M.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, H.; THOMPSON, F. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest soils. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 60, p. 840-841, 2010.

BÜRGMANN, H. **Activity and diversity of nitrogen-fixing microorganisms: novel tools to characterize populations in soil**. 167 p. Dissertation (Doctor in Science) - Swiss Federal Institut of Technology Zurich, Zurich, 2003.

BUSSE, H.J.; DENNER, E.B.M.; BUCZOLITS, S.; SALKINOJA-SALONEN, M.; BENNASAR, A.; KAMPFER, P. *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1253–1260, 2003.

BUSTAMANTE, M.M.C.; MARTINELLI, L.A.; SILVA, D.A.; CAMARGO, P.B.; KLINK, C.A.; DOMINGUES, T.F.; SANTOS, R.V. ¹⁵N natural abundance in woody plants and soils of central Brazil savannas (cerrado). **Ecological Applications**, Boulder, v. 14, p. 200-213, 2004.

- CAMPOS, M.M.S. **Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da floresta ombrófila densa das terras baixas, Ubatuba, São Paulo.** 102 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.
- CANOCO for Windows. 4.55. Wageningen: Biometrics-Plant Research International, 2006.
- CAPONE, D. Benthic nitrogen fixation. In: BLACKBURN, T.H.; SORENSEN, J. (Ed.). **Nitrogen cycling in coastal marine environments.** New Jersey: John Wiley, 1988. chap. 5, p. 85-123.
- CASSETARI, A. **Diversidade de bactérias nodulíferas da mata atlântica.** 96 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- CASTRO, D.D; SOUZA, M.; TAVARES, L.F. Estrutura da formação arbustiva aberta não inundável na Restinga da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 75-77, 2007.
- CHARYULU, P.B.B.N; RAJARAMAMOHAN, V. Influence of varios soils factors on nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. **Soil, Biology & Biochemical**, Oxford, v. 12, p. 343-346, 1980.
- CHEN, J.; SAUNDERS, SC.; CROW, T.R.; NAIMAN, RJ.; BROSOFSKE, K.D.; MROZ, G.D.; BROOKSHIRE, B.L.; FRANKLIN, J.F. Microclimate in forest ecosystem and landscape ecology. **Bioscience**, Washington, v. 49, p. 288-297, 1999.
- CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M.; **Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation.** Plymouth Marine. Disponível em: www.primere.com/Primary_papers.htm PRIMER-E, 2001.
- CLEVELAND, C.C; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H.; HOWARTH, R.W. HEDIN, O.L.; PERAKIS, S.S.; LATTY, E.F.; VON FISCHER, J.C.; ELSEROAD, A.; WASSON, M.F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, p. 623-645, 1999.
- COELHO, M.R.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N.; LANYON, C.V.; SELDIN, L.; O'DONELL, A.G. Molecular detection of *nifH* gene sequences in the rizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, Oklahoma, v. 42, p. 48-53, 2009.
- COMPUEYE LEAF & SYMPTOM AREA 11.001. Cairo, 2005. Disponível em: <http://www.ehabsoft.com/CompuEye/LeafSArea/>. Acesso em: 02 fev. 2011.
- CUSACK, D.F.; SILVER, W.; McDOWELL, H. Biological nitrogen fixation in two tropical forest: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystem**, New York, v. 12, p 1299-1315, 2009.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, London, v. 3, p. 470-478, 2005.

- DIXON, R.; KHAN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, London, v. 2, p. 621-631, 2004
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DUNCAN, N.; MENGE, L.; HEDIN, L. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120000-year chronosequence in New Zealand. **Ecology**, Davis, v. 90, n. 8, p. 2190-2201, 2009.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
- ETTEMA, T.J.G.; ANDERSSON, S.G.E. The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Biological Letter**, Edinburgh, v. 5, p. 429-432, 2009.
- FALKOWSKY, P.; FENCHEL, T.; DELONG, E. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. **Science**, Washintong, v. 320, p. 1034-1039, 2008.
- FRANCIS, C.A; BEMAN, J.M.; KUYPERS, M.M New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. **The Isme Journal**, New York, v. 1, p. 19-27, 2007.
- FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. **Oecologia**, Marburg, v. 17, p. 9-18, 1998.
- FURNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F.; SESSITSCH, A. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **The Isme Journal**, New York, v. 2, p. 561-570, 2008.
- GALLOWAY, J.; TOWNSEND, A.; ERISMAN, J.W., BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J.R.; MARTINELLI, L.A.; SEITZINGER, S.P.; SUTTON, S. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, Washington, v. 320, p. 889-892, 2008.
- GLIESSMAN, S.R. The plant. In: _____. **Agroecology: ecological process in sustainable agriculture**. Chelsea: An Arbor Press, 1997. chap. 3, p. 31-40.
- GLUBER, M.; HENNECKE, H. *fixA*, *B* and *C* genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation, **FEBS**, Heidelberg, v. 200, n. 1, p. 186-192, 1986.
- GOOSEM, S.; LAMB, D. Measurements of phyllosphere nitrogen fixation in a tropical and two sub-tropical rain forest. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 2, p. 373-376, 1986.
- GRUBE, M.; CARDINALE, M.; DE CASTRO, J.; MULLER, H.; BERG, GABRIELE. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 1105-1115, 2009.

HALBLEIB, C.; LUDDEN, P. Regulation of biological nitrogen fixation. **The Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene/ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Urbana, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HICKS, W.T.; HARMON, M.E.; GRIFFITHS, R.P. Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, USA. **Ecoscience**, Québec, v. 10, p. 66-73, 2003.

HOGBERG, P. ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, Lancaster, v. 137, n. 2, p. 179-203, 1997.

HOFMOCKEL, K.S.; SCHLESINGER, W.H. Carbon dioxide effects on heterotrophic dinitrogen fixation in a temperate pine forest. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, p. 140-144, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVAVEIS. **Ecosistemas brasileiros: Mata Atlântica**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/mata_atlantica.html>. Acesso: 02 jan. 2012.

JACKSON, C.R.; DENNEY, W.C. Annual and Seasonal Variation in the Phyllosphere Bacterial Community Associated with Leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 61, p. 113-122, 2011.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JESUS, E.; SUSILAWATI, E.; SMITH, E.; WANG, Q. CHAI, B.; FARRIS, R.; RODRIGUES, J.L.; THELEN, K.; TIEDJE, J. Bacterial communities in the rhizosphere of biofuel crops grown on marginal lands as evaluated by 16S rRNA gene pyrosequences. **Bioenergy Research**, New York, v. 3, p. 20-27, 2010.

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. A floresta inesperada. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 154, p. 86-87, 2008.

JONES, R.T.; ROBESON, M.S.; LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehensive survey of soils acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 442-453, 2009.

KAHN, D.; DAVID, M.; DOMERGUE, O.; DAVERAN, M.L.; GHAI, J.; HIRSCH, P.R.; BATUT, J. Rhizobium meliloti fixGHI sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, n. 2, 929-939, 1989.

KENNEDY, I.R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Queensland, v. 41, p. 447-457, 2001.

KENNEDY, I.R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, p. 93-118, 1992

KIM, M.; SINGH, D.; LAI-HOE, A.; GO, R.; RAHIM, R.A.; AINUDDIN, A.N.; CHUN, J.; ADAMS, J.M. Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 63, p. 674-681, 2012.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.E.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 58, p. 169-188, 2004.

KRANZ, R.K.; HASELKORN, R. Anaerobic regulation of nitrogen-fixation genes in *Rhodospseudomonas capsulata*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 6805-6809, 1986.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917, 2006.

LARIMER, F.W.; CHAIN, P.; HAUSER, L.; LAMERDIN, L.; MALFATTI, J.; DO, L.; LAND, M.; PELLETIER, A.D.; BEATTY, J.T.; LANG, A.; TABITA, F.R.; GIBSON, J.L.; HANSON, T.E.; BOBST, C.; TORRES, J.L.; PERES, C.; HARRISON, F.H.; GIBSON, J.; HARWOOD, C. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Nature Biotechnology**, London, v. 22, p. 55-61, 2004.

LASKAR, F.; SHARMA, G.D.; DEB, B. Biodiversity of diazotrophs *Derxia* and *Beijerinckia* in the rhizospheric and nonrhizospheric soils of rice plant. **Assam University Journal of Science & Technology**, Silchar, v. 5, n. 1, p. 154-162, 2010.

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a Major Cluster of *nif*, *fix*, and Associated Genes in a Sugarcane Endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 24, p. 7088-7091, 2000.

LIMA, J. **Diversidade de bacteria e Achaea em solos de mata atlântica no Estado de São Paulo**. 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LINDO, Z.; WHITELEY, J. Old trees contribute bio-available nitrogen through canopy bryophytes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 342, p. 141-148, 2011.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Madrid, v. 13, p. 238-243, 2002.

LONG, S. Rhizobium genetics. **Annual Review of Genetica**, New Jersey, v. 23, p. 483-506, 1989.

LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. **Current Topics Cellular Regulation**, Maryland, v. 30, p. 23–56, 1989.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 1058p.

MANIA, L.F.; MONTEIRO, R. Florística e ecologia de epífitas vasculares em um fragmento de floresta de restinga, Ubatuba, SP, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 4, p. 705-713, 2010.

MARDEGAN, S.; NARDOTO, G.; HIGUCHI, N.; MOREIRA, M.; MARTINELLI, L. Nitrogen availability patterns in white-sand vegetations of Central Brazilian Amazon. **Trees**, Vancouver, v. 23, p. 479-488, 2009.

MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C.; TRESEDER, K. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1/3, p. 45-65, 1999.

MARTINEZ, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed). **The prokaryotic**. New York: Springer, 2006. v. 2, chap. 1.24, p. 793-817.

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serrapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, Estado de São Paulo**. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MARTINS, S.C.; PICCOLO, M.C.; CAMARGO, P.B.; MARTINELLI, L.A.; ALMEIDA, D.Q.A.; ROSADA, C.A. Caracterização físico-química e isotópica do solo sob floresta ombrófila densa de terras baixas e restinga em Ubatuba, SP. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu: Editora, 2007. p. 1-3.

MASEPOHL, B.; KRANZ, R. Regulation of nitrogen fixation. In: HUNTER, C.N.; DALDAL, F.; THURNAUER, M.C.; BEATTY, T.J. (Ed.). **The purple phototrophic bacteria**. Amsterdam: Springer Science+ Business Media B.V., 2009. p. 759-775.

MATOS, D.M.; WATKINSON, A.R. The fecundity, seed, and seedling ecology of the edible palm *Euterpe edulis* in southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 4, p. 595-603, 1998.

MOREIRA, F.M.; SILVA, K. da; NÓBREGA, R.S.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Piuai, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MORELLATO, P.; TALORA, D.C.; TAKAHASI, A.; BENCKE, C.C.; ROMERA, E.C.; ZIPPARRO, V.P. Phenology of Atlantic Rain forest trees: a comparative study. **Biotropica**, Malden, v. 324, p. 811–823, 2000.

MULDER, E.G. Physiology and ecology of free living nitrogen-fixing bacteria. In: STWEART, W.D.P. (Ed). **Nitrogen fixation and free living microorganisms**. Cambridge: University press, 1975, p. 3-28.

MURRELL, J.C.; DALTON, H. Nitrogen fixation in obligate methanotrophs. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 129, p. 3481-3486, 1983.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. da; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 43, p. 853-858, 2000.

NACKE, H.; THURMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHONING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **Plos One**, Oxford, v. 6, n. 2, p. e17000, 2011.

NARDELLI, N. **Diversidade de cianobacterias na filosfera da mata atlântica do Estado de São Paulo**. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; EHLERINGER, J.R. HIGUCHI, N.; BUSTAMANTE, M.M.C.; MARTINELLI, L.A. Understanding the influences of spatial patterns on the N availability within the Brazilian Amazon Forest. **Ecosystems**, Wisconsin, v. 11, p. 1234-1246, 2008.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades bacterianas na filosfera e suas relações com a espécie vegetal e compostos orgânicos voláteis**. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAUL, E.A.; CLARK F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1996. 276 p.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen-fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 14, p. 13-39, 1992.

PÉREZ, C.A.; CARMONA, M.R.; ARMESTO, J.J. Non-symbiotic nitrogen fixation during leaf litter decomposition in an old-growth temperate rain forest of Chiloé Island, southern Chile: Effects of single *versus* mixed species litter. **Austral Ecology**, Adelaide, v. 35, p. 148-156, 2010.

PÉREZ, S.E.; PÉREZ, C.A.; CARMONA, M.R.; FARIÑA, J.M.; ARMESTO, J.J. Efectos del fósforo y carbono lábiles em la fijación no-simbiótica de N₂ em hojarasca de bosques siempreverdes manejados y no manejados de la Isla de Chiloé, Chile. **Revista Chilena de Historia Natural**, Concepción, v. 81, p. 267–78, 2008.

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S., GOURBIE`RE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2255–2262, 2001.

PRIMER 5. **PRIMER-E Ltd 5.2.6**. Devon, 2001.

CENTRO DE PREVISAO DETEMPO E ESTUDOS CLIMATICOS. Projeto Serra do Mar. Disponível em: < <http://serradomar.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: jul 30 de 2012.

PROSSER, J.I. Microorganisms cycling soil nutrients and their diversity. In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.; TREVORS, J. (Ed). **Modern soil microbiology**. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2007. chap. 9, p. 237-261.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1991. 240 p.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REDFORD, A.; BOWERS, R.M.; KNIGHT, R.; LINHART, Y.; FIERER, N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 2885-2893, 2010.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. **Biotropica**, Malden, v. 39, p. 585-592, 2007.

_____. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest, **Ecology**, Davis, v. 89, p. 2924-2934, 2008.

_____. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 42, p. 489-512, 2011.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; NEMERGUT, D.R. Microbial community shifts influence patterns in tropical Forest nitrogen Fixation. **Oecologia**, Marburg, v. 164, p. 521-531, 2010.

REED, S.C.; SEASTEDT, T.; MANN, C.; SUDING, K.; TOWNSEND, A.R.; CHERWIN, K. Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. **Applied Soil Ecology**, v. 36, p. 238-242, 2007.

RE-JORGE, L. **Plasticidade fenotípica e herbivoria na uvira, *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) em ambiente de duna e restinga** Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/curso/2007/pdf/individuais/I_leonardo_re_jorge.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2012.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; JACQUES, R.; BENTO, F.; CAMARGO, F.A. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal Microbiology of Biotechnology**, Hull, v. 26, p. 1503-1508, 2010.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H. CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrast soil microbial diversity. **International Society for Microbial Ecology**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROMAGNOLI, N. **Diversidade e abundância de fixadores de N de vida livre e micro-organismos amônio-oxidantes em solos de mata atlântica do Estado de São Paulo**. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

RUIZ, W.F. **Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica**. 2010. 108 p. (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SANCHEZ, M. **Composição florística e estrutura da comunidade arbórea num gradiente altitudinal da Mata Atlântica**. 2001. 123 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTOS, M.; POETA, P.C.; JUNIOR, F.; VAILATI, M.; PAULILO, P. Aspectos estruturais de folhas de indivíduos de *Guapira opposita* (Vell) Reitz (Nyctaginaceae) ocorrentes em restinga e na floresta ombrófila densa. **Revista de Botânica**, Florianópolis, v. 39, p. 59-78, 2010.

SARITA, S.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J.; SHARMA, P.K. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, Bangalore, v. 94, n. 1, p. 109-114, 2008.

SATO, C.A. **Caracterização da fertilidade do solo e da composição mineral de espécies arbóreas de restinga do litoral paulista**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER E.; R. MARGESIN. 1995. **Methods in soil biology**. Springer: Berlin, p 425.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHMIDT, T.M.; ARIELI, B.; COHEN, Y.; PADAN, E.; STROHL, W. Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba*. **Journal of Bacteriology**, Princeton, v. 169, n. 12, p. 5466-5472, 1987.

SEEFELDT, L.C.; DANCE, I.G.; DEAN, D.R. Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. **Biochemistry**, Brisbane, v. 43, p. 1401-1409, 2004.

SIGMAPLOT. **Systat software Inc 11.0**. San Jose, 2008.

SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte biological nitrogen fixation in grassland with different cutting intensities. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 59, n. 225, p. 21-30, 2010.

SON, Y. Non-symbiotic nitrogen fixation in fores ecosystem. **Ecological Research**, Tokyo, v. 16, p. 183-196, 2001.

- SOUZA, C.R.G H.; IRUMA, S.T.; MARTINS SALLUN, A.E.; RIBEIRO, R.R.; SOBRINHO, J.M.A. **Restinga**: conceitos e empregos do termo no Brasil e implicações na legislação ambiental. São Paulo: Instituto Geológico, 2008. 104 p.
- SUGIYAMA, M. Estudo de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, n. 11, p. 119-159, 1998.
- SURFER MAPPING SYSTEM. **Golden Software Inc 8,02**. Colorado, 2002.
- SUTHERLAND, R.A.; KESSEL, C, PENNOCK, D.J. Spatial variability of nitrogen-15 natural abundance. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 55, p. 1339–1347, 1991.
- TALORA, D.; MORELLATO, P. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 13-26, 2000.
- TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK. B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 1009-1015, 2003.
- THOMPSON, W.A.; KRIEDERMANN, P.E.; CHAIG, I.E. Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. I. Growth, leaf anatomy and nutrient content. **Australian Journal of Plant Physiology**, Camberra, v. 71, p. 23-31, 1992.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial phylogeny and diversity in soil. In: VAN ELSAS, J.D; JANSSON, J.K.; TREVORS, J., (Ed.). **Modern soil microbiology**. Boca Raton: CRC Press; Taylor and Francis Group, 2007. chap. 2, p.23-54.
- UCHINO, F.; HAMBALI, G.G.; YATAZAWA, M. Nitrogen-fixing bacteria from warty lenticellate bark of a mangrove tree, *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 44-48, 1984.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VITOUSEK, P. Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawai'i Volcanoes National Park. **Biotropica**, Malden, v. 26, n. 3, p. 234-240, 1994.
- VITOUSEK, V.; HOBBIE, S. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. **Ecology**, Davis, v. 81, p. 2366-2376, 2000.
- VITOUSEK, P.; HOWARTH, W. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.
- VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.; SPREN, J. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 58, p.1–45, 2002.

WAGNER, M.; HORN, M. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. **Current Opinion in Biotechnology**, Madrid, v.17, p. 241-249, 2006.

WARD, N.; CHALLACOMBE, J.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M. XIE, G. HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, C.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DEBOY, R.T; DETTER, J.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; TOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2046-2056, 2009.

WU, N.; ZHANG, Y.M.; DOWNING, A. Comparative study of nitrification activity in different types of biological soil crusts in the Gurbantunggut Desert, Northwestern China. **Journal of Arid Environments**, Chubut, v. 73, p. 828-833, 2009.

YANG, C.H., CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of National Academic of Science of the USA**, Washington, v. 98, p. 3889-3894, 2001.

ZANELATO, D. **A alocação de biomassa entre parte aérea e raízes de *Euterpe edulis* (arecaceae) depende da disponibilidade de nutrientes?** Disponível em: <<http://ecologia.ib.usp.br/curso/2010/pages/pdf/PI/relatorios/Daniela.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

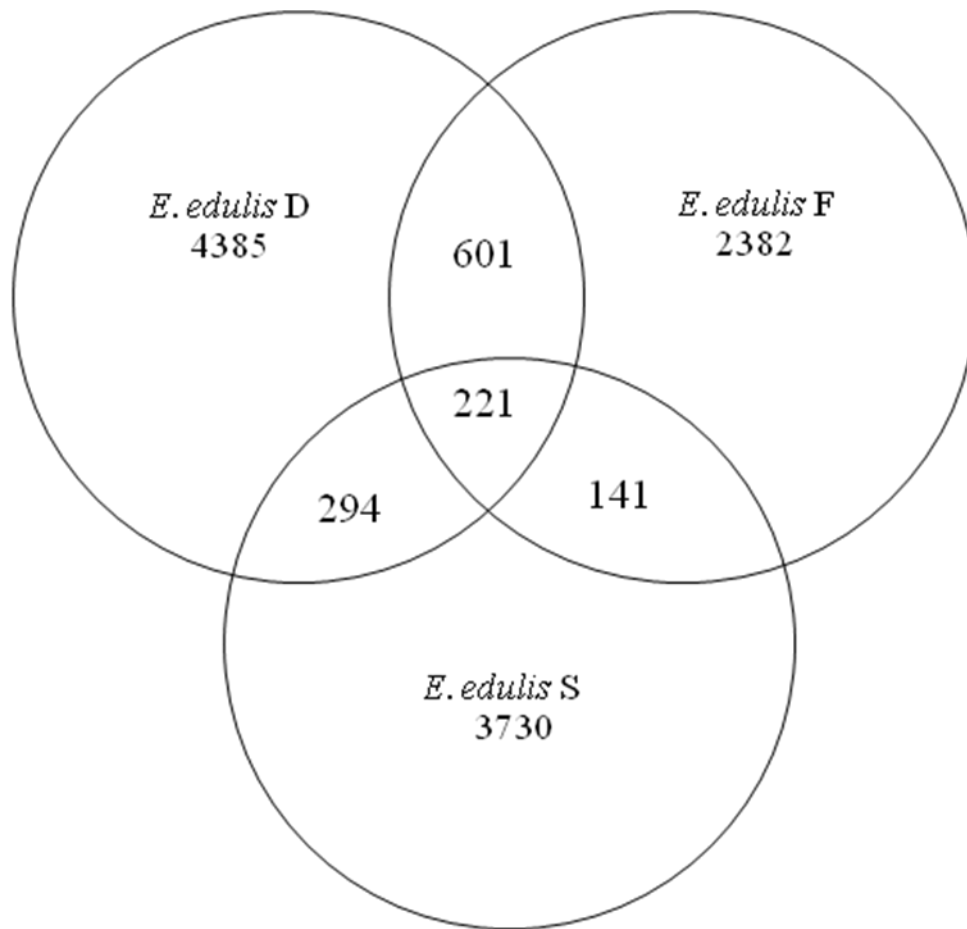
ZEHR, J.P., JENKINS, B.D., SHORT, S.M. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539-554, 2003.

ANEXOS

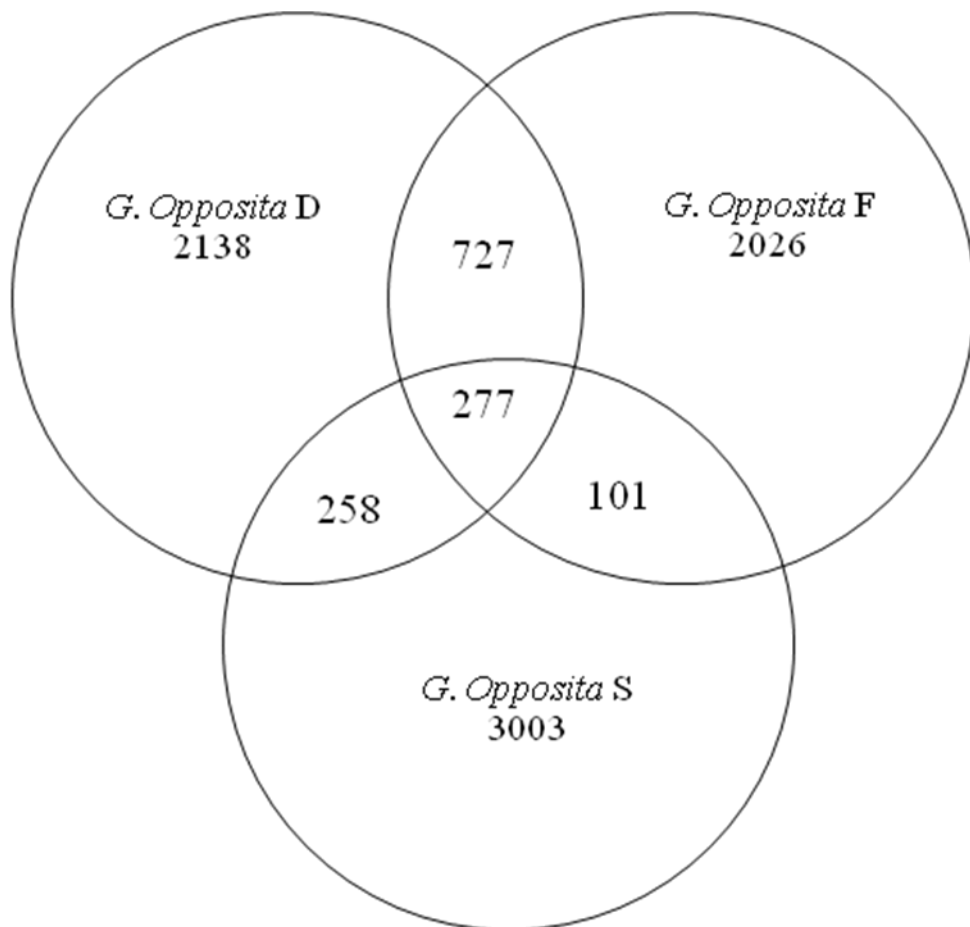
Anexo A - Abundância natural $\delta^{15}\text{N}$, nos três compartimentos de *E. edulis* e *G. opposita* em cada época de coleta

Baixa Pluviosidade	Solo	Dermosfera	Filosfera
<i>Euterpe edulis</i>	2,9±0,2aA	-0,2±0,5bB	-1,3±0,5bB
<i>Guapira opposita</i>	2,7±0,3aA	2,0±0,6aA	1,5±0,3aA
Alta Pluviosidade	Solo	Dermosfera	Filosfera
<i>Euterpe edulis</i>	2,7±0,3aA	-0,7±0,3bB	-0,5±0,4bB
<i>Guapira opposita</i>	2,8±0,2aA	1,0±0,3bA	1,2±0,4bA

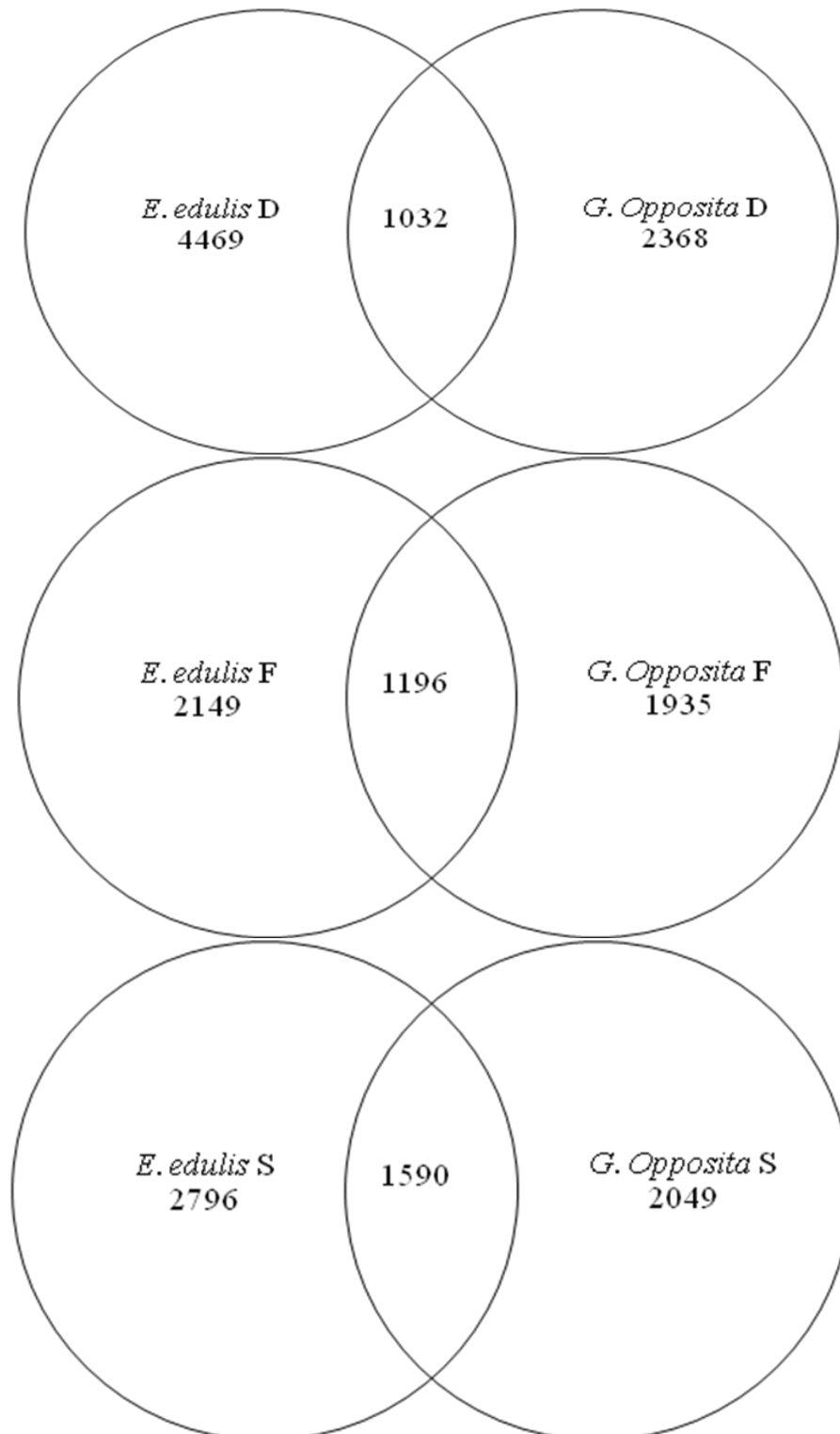
Os dados representam as médias \pm desvio padrão. Letras minúsculas iguais dentro da mesma linha não diferem significativamente entre compartimentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre espécies pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



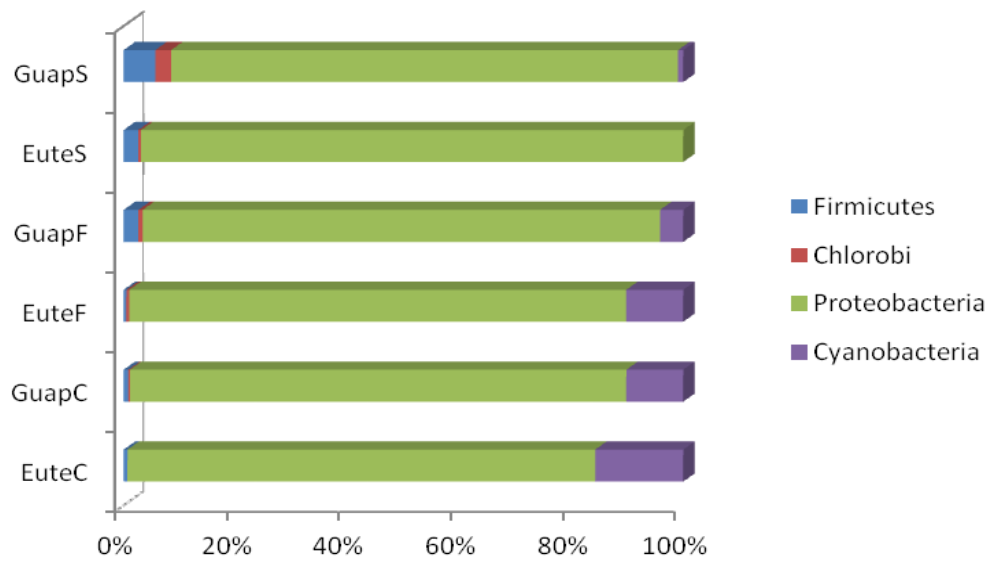
Anexo B - Diagramas de Vem representando a abundância relativa das diferentes UTOs identificadas pelo MOTHUR nos diferentes compartimentos de *E. edulis*.



Anexo C - Diagramas de Vem representando a abundância relativa das diferentes UTOs identificadas pelo MOTHUR nos diferentes compartimentos de *G. opposita*.



Anexo D - Diagramas de Vem representando a frequência relativa das diferentes UTOs identificadas pelo MOTHUR nos diferentes compartimentos entre as espécies



Anexo E - Distribuição taxonômica ao nível de Filo das bactérias fixadoras de N₂