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

**Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do
nitrogênio na Mata Atlântica**

Sandra Patrícia Montenegro Gómez

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2012**

Sandra Patrícia Montenegro Gómez
Licenciada em biologia e química

**Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na
Mata Atlântica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2012**

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

Montenegro Gómez, Sandra Patrícia

Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica / Sandra Patrícia Montenegro Gómez.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

110 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Biodiversidade 3. Fixação biológica de nitrogênio 4. Florestas tropicais 5. Mata Atlântica I. Título

CDD 589.95
M777d

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

A todos que me apoiaram emocionalmente ao longo desta história

DEDICO

À natureza

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, incentivo e confiança ao longo desses quatro anos.

Ao programa de Microbiologia Agrícola e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela oportunidade de crescimento profissional e por fornecer estrutura para a realização do trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida; ao Biota Fapesp pelo auxílio financeiro para desenvolvimento do projeto.

Aos professores Plinio Camargo Antonio Martinelli pelas análises isotópicas. À professora Dra. Simone Vieira por fornecer informações das árvores amostradas.

Ao Prof. Dr. Fernando Andreote, pelas sugestões durante o exame de qualificação e pela assessoria nos outros momentos em que precisei.

Aos professores Dr. Carlos Eduardo Pellegrino Cerri e Dra. Briggite Feigel pela participação no exame de qualificação e por todas as sugestões durante o exame.

Aos funcionários dos laboratórios coordenados pelos professores ELKE CARDOSO: Denise e Fernando; MARCIO LAMBAIS: Wladimir; LUÍS REYNALDO FERRACCIÚ ALLEONI: Luiz Silva; SIU MUI TSAI: Francisco “Chiquinho” e José Elias; ANTONIO MARTINELLI e PLÍNIO CAMARGO: Fabiana e Antônia. Obrigada pelo grande auxílio e pela amizade.

Ao José do laboratório de espectrometria de massas da UNICAMP. Sua ajuda foi fundamental para as análises cromatográficas.

Ao meu eterno professor e grande amigo Juan Carlos Menjivar, pelo constante apoio emocional e profissional. O senhor me acompanhou nesta história do começo ao fim. Obrigada pela força dada a mim durante todos estes anos.

Ao Jairo Vladimir Llano, meu companheiro de sempre, obrigada pelo seu estímulo em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular: Alice Cassetari, Joze Correa, Kelly Justin, Lucas Lopes, Rafael Valadares, Sílvia Barrera, Winston Franz Ruiz, Wladimir Rosignolo, Viviam Carvalho e, em especial, a Eder dos Santos, Adriano Lucheta, Kelly Justin, Rafael Armas, Cebelle Souza, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Também agradeço ao grupo de pessoas que me acompanhou ao longo das árduas e inesquecíveis viagens para o maravilhoso Parque Estadual da Serra do Mar.

Aos meus amigos da Colômbia em Piracicaba. Nossos encontros foram fundamentais para superar os momentos de saudade de nossas famílias.

Às minhas grandes e guerreiras amigas Miriam e Elizabeth. Sua amizade sempre me dá muita força para caminhar em frente.

À minha família, em especial minha tia Emir, que sempre esteve presente nestes anos de afastamento. Obrigada minha família! Eu os quero muito!

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de diferentes formas para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço de coração ao Brasil e ao seu povo pelas experiências vividas. Foram quatro anos maravilhosos. Obrigada Brasil!

O destino é que embaralha as cartas.

Mas nós somos os que jogamos

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 Nitrogênio na natureza.....	17
2.1.2 Disponibilidade de N na Mata Atlântica	17
2.1.3 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico	19
2.1.3.1 Bioquímica e genética da FBN.....	19
2.1.3.1.1 Genes da FBN	20
2.1.3.1.2 Regulação da FBN.....	21
2.1.4 Identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir dos Genes nif e rRNA 16S.....	23
2.1.4 FBN de vida livre.....	23
2.1.4.1 Fatores que influenciam na FBN de vida livre	24
2.1.4.2 FBN de vida livre em florestas tropicais	26
2.2 Material e métodos	30
2.2.1 Descrição das áreas de amostragem	30
2.2.2 Amostragem	32
2.2.3 Análises químicas de solo sob a copa das árvores estudadas.....	35
2.2.4 Determinações da razão isotópica do $^{15}\text{N}/\text{N}^{14}$ e determinação de C e N total ...	35
2.2.5 Determinação da atividade da nitrogenase por redução de acetileno (ARA) e transformação para taxas de FBN	36
2.2.6 Análise da diversidade bacteriana	38
2.2.6.1 Desalojamento dos micro-organismos da filosfera e dermosfera	38
2.2.6.2 Extração de DNA	38
2.2.6.3 Amplificação do gene rRNA 16S por PCR para pirosequenciamento.....	39
2.2.7 Análises de sequências	40
2.2.8 Análise estatística	41
2.3 Resultados e discussão	42
2.3.1 Caracterização química dos solos estudados.....	42
2.3.2 Atividade da nitrogenase ao longo do perfil vertical das árvores	44

2.3.2.1 Atividade da nitrogenase no solo sob a projeção da copa	46
2.3.2.2 Atividade da nitrogenase na filosfera	51
2.3.2.3 Atividade da nitrogenase na dermosfera	53
2.3.3 Concentração e variação do ^{15}N ao longo do perfil vertical das árvores	56
2.3.3.1 Variação no $\delta^{15}\text{N}$ do solo sob a copa	58
2.3.3.2 Variação no $\delta^{15}\text{N}$ foliar	59
2.3.3.3 Variação do $\delta^{15}\text{N}$ na dermosfera	59
2.3.4 Influência da variabilidade espacial na estimativa de taxas de FBN de vida livre.....	60
2.3.5 Comunidades bacterianas associadas a espécies de arbóreas.....	66
2.3.5.1 Presença de possíveis diazotróficos de vida livre associados com as espécies arbóreas	74
2.3.5.1.1 Predomínio de possíveis diazotróficas de vida livre em nível de classe e gênero dentro do filo das proteobactérias	76
2.3.5.1.2 Cianobactérias detectadas ao longo do perfil das espécies arbóreas.....	82
3 CONCLUSÕES	85
REFRÊNCIAS	87
ANEXOS	107

RESUMO

Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica

O presente trabalho estudou as relações entre as taxas de fixação biológica de nitrogênio (FBN), a composição e a diversidade da comunidade de bactérias diazotróficas de vida livre em três compartimentos: solo sob a copa, filosfera e dermosfera de diferentes espécies arbóreas, sendo que dermosfera foi avaliada em apenas duas espécies. As plantas escolhidas foram *Euterpe edulis* (Palmito juçara) *Guapira opposita* (Louro-branco) e *Merostachys neesii* (Bambu) presentes na Floresta Ombrófila Densa (FOD) de terras baixas e montanas do Parque Estadual da Serra do Mar, no Estado de São Paulo – Brasil. As taxas de FBN foram estimadas pela técnica de redução de acetileno (ARA) através da relação teórica 3:1, baseada na redução de três moles de acetileno para cada mol de N fixado, e a composição da comunidade bacteriana foi acessada pelo sequenciamento parcial do gene rRNA 16S usando pirosequenciador. Foram encontradas diferenças nas estimativas das taxas de FBN que variaram entre as espécies arbóreas e principalmente entre os substratos. Os testes de comparação de médias indicaram que, nas árvores amostradas, as taxas de FBN aumentaram na ordem: solo sob a projeção da copa, filosfera e dermosfera. A maior FBN foi observada na dermosfera de *E. edulis*, no PESH-Santa Virginia, durante o verão ($630,12 \pm 27,28 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) e a menor FBN no solo de *G. opposita* PESH-Santa Virginia, também no verão ($0,49 \pm 0,17 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$). A FBN da serapilheira e do solo não associado com as espécies arbóreas apresentou grande variabilidade espacial nas duas áreas amostradas, mas não apresentou variações sazonais. O pirosequenciamento do gene rRNA 16S mostrou que solo sob a copa, filosfera e dermosfera das espécies arbóreas avaliadas possuem comunidades bacterianas distintas, além destas serem também influenciadas pelo local de amostragem. A comunidade epifítica da dermosfera também foi influenciada pela espécie arbórea. Foram obtidas 423210 sequências que foram agrupadas em 35216 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), distribuídas em 32 filos, dentre os quais o mais abundante foi o filo Proteobacteria (36,6%). Dos possíveis diazotróficos observados, o filo Proteobacteria foi dominante nos três compartimentos avaliados, com predomínio da classe Alphaproteobacteria, principalmente na filosfera de *M. neesii*. A presença de cianobactérias foi maior na dermosfera, e Firmicutes no solo sob a projeção da copa, sugerindo que a comunidade bacteriana é altamente diversificada e tende variar espacialmente.

Palavras- chave: Bactérias fixadoras de nitrogênio; Biodiversidade; Fixação biológica de nitrogênio; Florestas tropicais; Mata Atlântica.

ABSTRACT

Diversity of diazotrophic bacteria and biological nitrogen fixation in Brazilian Atlantic Rainforest

In this study we estimate the relationship between biological nitrogen fixation (BNF) rates and composition and diversity of free-living diazotrophic bacteria in phyllosphere and soil under the canopy of tree species, *Euterpe edulis* (Juçara palmito), *Guapira opposita* ("Louro-branco"), and *Merostachys neesii* (Bamboo) in lowland and montane dense ombrophilous forests (DOFs) at the Serra do Mar State Park, Brazil; bark was also evaluated in the first two tree species. BNF rates were estimated by acetylene reduction activity (ARA) using the 3:1 theoretical ratio, based on the reduction of three acetylene moles per each N mole fixed. Bacterial community composition was evaluated by partial 16S rRNA gene sequencing with a pyrosequencer. Analysis of variance showed highly significant estimated for BNF rates, which widely varied between tree species and especially between substrates. Mean comparison tests indicated that higher BNF rates followed the following order: soil under projected canopy, phyllosphere, and bark, respectively. The highest BNF rate was observed in *E. edulis* bark ($630.12 \pm 27.28 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) and the lowest BNF rate in soil under *G. opposita* canopy ($0.49 \pm 0.17 \text{ ng N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), both at the PESM-Santa Virginia site in the summer. The BNF in leaf litter and soil unassociated with tree species exhibited high spatial variability in two sampling sites, but this does not indicate a temporal trend in higher BNF rates between winter and summer. Pyrosequencing of the rRNA 16S gene showed that each component of the tree species evaluated harbors a distinct bacterial community. In bark, phyllosphere, and soil the under projected canopy of trees sampled, the results demonstrated influence by sampling site. We also observed that there was influence of tree species on the epiphytic community in bark. The 423, 210 sequences obtained were grouped into 35,216 operational taxonomic units (OTUs), distributed among 32 phyla, with highest abundance of Proteobacteria (36.6%). Between the possible diazotrophs observed, Proteobacteria was dominant among the three components evaluated, with predominance of the class Alphaproteobacteria, especially in *M. neesii* phyllosphere. The presence of cyanobacteria was higher in bark and Firmicutes in soil under projected canopy of the trees sampled, suggesting that the bacterial community is highly diverse and tends to spatially vary.

Keywords: Nitrogen-fixing bacteria; Biodiversity; BNF; Tropical forest; Atlantic Rainforest

1 INTRODUÇÃO

As florestas úmidas tropicais são caracterizadas por grandes aportes de N (N) (CUSACK, 2009), sendo geralmente mais ricas nesse nutriente do que florestas temperadas, com enriquecimento em ^{15}N em folhas e solos, com abundância média acima de 8‰ (MARTINELLI, 1999). As florestas tropicais respondem de forma diferente às entradas de N (GALLOWAY, 2008) devido à maior ciclagem deste elemento (MARTINELLI et al., 1999). A intensa radiação solar e a grande quantidade de chuva nas regiões de clima tropical fazem com que as taxas de decomposição da matéria orgânica do solo sejam elevadas, acarretando em uma intensa atividade microbiana e eficiente ciclagem dos nutrientes (SPACCINI et al., 2002).

Embora em florestas tropicais como a Amazônica a abundância de N seja maior do que nas florestas temperadas, os processos de alocação de N podem ser diferentes em florestas tropicais distintas. Nesse contexto este processo na Mata Atlântica deve diferir do da Floresta Amazônica, já que os solos das florestas que encobrem as encostas da Serra do Mar são mais rasos e mais pobres em N que os da Amazônia. No entanto, esse mesmo solo raso e pobre sustenta uma floresta com uma diversidade de espécies vegetais três vezes maior caso consideradas epífitas como bromélias e orquídeas, mesmo com uma quantidade menor de nitrogênio (JOLY; MARTINELLI, 2008).

Os mecanismos de ciclagem do N nas florestas tropicais são pouco conhecidos (MATSON et al., 2002). Comparações em nível de bioma sugerem que as florestas tropicais podem fixar mais N do que qualquer outro ecossistema (STEDMAN; SHETTER 1983, CLEVELAND et al., 1999, GALLOWAY et al., 2004). No entanto, os dados sobre as taxas de FBN em florestas são muito divergentes.

Alguns estudos sugerem que a FBN em árvores leguminosas não é tão frequente em florestas tropicais maduras, e que seu papel é quase nulo em florestas de terras baixas (GEHRING et al., 2005). Em contraste, sabe-se menos sobre a FBN de vida livre, e existem grandes incertezas sobre suas contribuições para o aporte total de N em florestas tropicais, além dos fatores que regulam este processo.

Em ecossistemas de floresta as estimativas de FBN têm sido, em maior escala, direcionadas para os estudos de solos. No entanto, estudos sobre FBN na parte aérea das plantas indicam aportes significativos de N para as florestas tropicais

úmidas (LEARY et al., 2004) em líquens (FORMAN 1975; BENNER et al., 2007), musgos (GENTILI et al., 2005) e biofilme de folhas associados com cianobactérias (GOOSEM; LAMB, 1986, BENTLEY et al., 1987). Os poucos estudos na filosfera de algumas espécies arbóreas tropicais indicam valores variando de pouco menos de $1 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (CARPENTER 1992; GOOSEM; LAMB 1986; REED et al., 2008) até $8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ na dermosfera (dermosfera de galhos e caules) de árvores (FORMAN, 1975). Esses resultados sugerem que o balanço do N está associado a vários componentes, e que a FBN na parte aérea das plantas contribui significativamente para o aporte de N nos ecossistemas, embora com muita heterogeneidade entre os ambientes avaliados. Estimativas da FBN na filosfera e dermosfera em florestas tropicais podem contribuir para uma melhor estimativa dos aportes de N e melhor entendimento da ciclagem de N nesses ecossistemas.

As taxas de FBN são dependentes da abundância e diversidade de bactérias diazotróficas e de sua distribuição espacial (REED et al., 2010). A capacidade de realizar FBN tem sido detectada em diazotróficos de diferentes grupos filogenéticos e propriedades fisiológicas como, por exemplo, micro-organismos fototróficos aeróbios (*cianobactérias*), fototróficos anaeróbios, (bactérias púrpura e verdes do enxofre, *Cromatium* e *clorobium* respectivamente), quimiolitotróficos e quimiorganotróficos (BÜRGMANN 2003).

O presente trabalho teve como objetivos estimar a quantidade de N fixado biologicamente e identificar as populações de bactérias diazotróficas, na filosfera e solo sob a projeção da copa das espécies arbóreas *Euterpe edulis* (palmito juçara), *Guapira opposita* (louro-branco), *Merostachys neesii* (bambu) e na dermosfera (superfície da casca) das duas primeiras espécies mencionadas, em Florestas Ombrófilas Densas de Terras Baixas e Montana, nos Núcleos Picinguaba e Santa Virginia do Parque Estadual da Serra do Mar (Ubatuba, SP).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Nitrogênio na natureza

O nitrogênio (N) ocupa a quarta posição como elemento mais comum em tecidos vivos, ficando atrás do oxigênio, do carbono e do hidrogênio. É um componente essencial das proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, e outras importantes moléculas orgânicas. No entanto o N₂, que compõe cerca de 78% da atmosfera, não é assimilável pelos eucariotos (incluindo as plantas) e nem pela maioria dos procariotos (VITOUSEK, 1997).

Galloway (2004) classifica os compostos nitrogenados da natureza, como N-não-reativo e N-reativo (Nr). O N não-reativo é o N₂, e o Nr é toda forma biológica, fotoquímica e radioativamente ativa de compostos de N presentes atmosfera e biosfera, incluindo as formas orgânicas reduzidas (ex. amônia [NH₃]), formas oxidadas inorgânicas (ex. óxido de nitrogênio [NO_x], ácido nítrico [HNO₃], óxido nitroso [N₂O], nitrato [NO₃⁻] e nitrito [N₂O⁻]), e compostos orgânicos (ex. uréia, aminas, proteínas e ácidos nucleicos). A transferência seqüencial desse Nr através dos sistemas ambientais é chamada dermosferata do N.

Nas florestas tropicais, grande quantidade de N circula anualmente (MARTINELLI et al., 1999) e as taxas de mineralização de N são altas (exceto em Espodossolos) (LUIZÃO et al., 2004; PICCOLO et al., 1996; NARDOTO 2005). Porém, é difícil relacionar esta informação com a disponibilidade de nitrogênio para as plantas (VITOUSEK, 1986), já que o ciclo do N é controlado por fatores físicos, químicos e biológicos, além de condições climáticas que são difíceis de serem previstas e controladas (CANTARELLA, 2007).

2.1.2 Disponibilidade de N na Mata Atlântica

A Mata Atlântica, que possui cerca de 65 milhões de anos, é uma das florestas mais antigas do mundo. Sua vegetação, uma das mais ricas do planeta, é

conhecida principalmente por sua exuberância e diversidade (JOLY; MARTINELLI, 2008) sendo considerada a floresta mais rica do mundo em diversidade de árvores quando considerado apenas o grupo das angiospermas. Acredita-se que o Brasil possua entre 55.000 a 60.000 espécies, ou seja, de 22% a 24% do total estimado existente no mundo. Desse total, as projeções indicam que este bioma tenha cerca de 20.000 espécies, ou seja, entre 33 e 36% das existentes no País, sendo 8 mil delas endêmicas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2010).

Os solos da Mata Atlântica que encobrem as encostas da Serra do Mar são rasos e pobres em nitrogênio quando comparados com aos da Amazônia. Portanto, como explicar a maior exuberância em diversidade vegetal? Acredita-se que essa floresta funcione de modo diferente, possuindo possivelmente metade do já pouco nitrogênio encontrado na Amazônia ($1,2 \text{ g kg}^{-1}$) (SILVA, 2006) embora, seja mais do que o encontrado nas florestas temperadas européias, bastante modestas em biodiversidade se comparadas com as da América (JOLY; MARTINELLI, 2008).

Além dos contrastes entre as maiores florestas do Brasil, existem diferenças no interior da própria Mata Atlântica. Os solos das matas presentes entre 5-50 m de altitude são rasos e mais pobres em nutrientes do que os entre 800 a 1200 m de altitude (JOLY; MARTINELLI, 2008). As concentrações de N variam de 0,1 a $1,8 \text{ g kg}^{-1}$ nos solos a 0 m; de 0,7 a $3,4 \text{ g kg}^{-1}$ à 100m; de 0,8 a $4,6 \text{ g kg}^{-1}$ à 400m; e de 0,8 a $4,6 \text{ g kg}^{-1}$ à 1000m, indicando aumento progressivo de N em relação à altitude (MARTINS, 2010).

A produção e a decomposição de serapilheira são fatores importantes no fluxo de N, influenciando nos estoques e na ciclagem de N nos solos. A decomposição da serapilheira pode estimular a mineralização do N e a nitrificação (CHEN et al., 1999). Martins (2010) observou um maior enriquecimento na concentração de ^{15}N na serapilheira coletada na Serra do Mar a 100m de altitude (terras baixas) do que a 1000m (Montanas). Esses dados sugerem que a 100m as taxas de mineralização do N e nitrificação foram maiores (HANDLEY; RAVEN, 1993).

A FBN representa a principal fonte de N para a biosfera terrestre (GALLOWAY et al., 1995; VITOUSEK et al., 1997) e pode ter relevância na ciclagem de N nas florestas tropicais (GALLOWAY, 2008). Alguns estudos realizados recentemente nos núcleos de Picinguaba e Santa Virginia indicam uma dinâmica na

FBN mediada principalmente por bactérias diazotróficas de vida livre em solo e filosfera (CASSETARI, 2010; GONÇALVES, 2011; ROMAGNOLI, 2011).

2.1.3 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico

A FBN é responsável pela maior parte de N fixado no planeta (175×10^6 toneladas por ano). Já as descargas elétricas, que representam a fonte primária de fixação abiótica de nitrogênio, contribuem com 30×10^6 toneladas por ano.

A FBN é realizada por micro-organismos dos domínios Bactéria e Archaea, e pode ser simbiótica ou de vida livre (assimbiótica). A FBN simbiótica em florestas envolve principalmente associação entre leguminosas e rizóbios, enquanto que a FBN assimbiótica pode ser realizada por uma grande diversidade de micro-organismos, tanto na serapilheira quanto na superfície das plantas. É realizada principalmente por fototróficos quando localizados em filosfera e dermosfera, e por heterotróficos quando no solo e serapilheira (REED, et al., 2008).

A FBN gera um alto custo metabólico para os organismos envolvidos, já que esse processo depende da atividade de um sistema enzimático chamado nitrogenase. Este sistema utiliza de pelo menos 16 ATPs para cada molécula de N_2 formada (SIMPSON; BURRIS, 1984; RAYMOND, 2004).

2.1.3.1 Bioquímica e genética da FBN

A FBN de nitrogênio é um processo complexo que envolve uma série de genes estruturais e regulatórios (TRIPLETT et al., 1989). É executada pelo complexo protéico nitrogenase, composto por duas unidades básicas: a nitrogenase ou ferro-molibdênio proteína (MoFe-proteína) e a nitrogenase redutase ou ferro-nitrogense (Fe-proteína). Os aglomerados de Molibdênio-ferro-enxofre-homocitrato da MoFe proteína são os verdadeiros locais de ligação e redução do N_2 e também de outros substratos alternativos como o acetileno. Por fim, a Fe proteína é responsável por transportar elétrons para a MoFe proteína usando pelo menos dois MgATP por elétron, tal como representado pela equação (1) (BURGMANN 2000).

A estrutura, biossíntese e regulação da nitrogenase são determinadas pelos genes *nif*, que são encontrados em todos os diazotróficos (de vida livre, associativos e simbióticos).

2.1.3.1.1 Genes da FBN

A descoberta dos genes envolvidos na FBN foi resultado do estudo da genética da fixação de nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* (STREICHER et al., 1972; DIXON; POSTGATE, 1972; CANNON et al., 1976; DIXON et al., 1976). Foram identificados 20 genes, organizados em 7-9 operons. Dentre esses genes, 14 têm sido encontrados na maioria dos diazotrófos estudados. Devido ao envolvimento direto com o processo de FBN, estas regiões codificadoras foram denominadas genes *nif*. Os genes *nifHDK* são responsáveis por codificar as proteínas estruturais do complexo enzimático. A proteína MoFe é codificada pelos genes *nifDK*. Por fim, a Fe-proteína é um dímero produto do gene *nifH*. Um único regulador (Fe_4S_4) é simetricamente coordenado entre as subunidades, sendo este regulador o centro redox-ativo diretamente envolvido na transferência de elétrons para a proteína MoFe (HELBELIB; LUDDEN 2000). Esses genes, juntamente com genes reguladores e genes que codificam para outras enzimas envolvidas na transferência de elétrons e aglomerado de metais, compreendem o regulon *nif*.

Além dos genes *nif* tem sido observado que, em certos diazotróficos, outros genes como os genes *ntrA*, *ntrBC*, *fix*, *fdx*, *rnf* e *nod* codificam para proteínas que indiretamente desempenham funções essenciais para a FBN como a regulação em nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoramento e sinalização do nível de N celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e estabelecimento da interação bactéria-planta (TEIXEIRA, 1997).

Os operons (FeMo-Co), *nifDK* e *nifEN* normalmente aparecem em conjunto. Estes operons são complementados por outros genes que codificam para proteínas envolvidas no transporte de elétrons (ex. *nifF* e *nifJ* em *Kebsiella Pneumoniae*), regulação (ex. *nifA*) (DEAN; JACOBSON, 1992), ou na síntese do cofator Fe-Mo (ex, *nifB*, *nifV* em *Kebsiella Pneumoniae*) (TRIPLETT et al., 1989).

2.1.3.1.2 Regulação da FBN

Devido à alta demanda por energia, o processo de FBN é rigorosamente regulado em diferentes níveis. Os organismos estudados até agora apresentam regulação em nível de transcrição em resposta aos altos conteúdos de oxigênio e de amônio, sendo que o grau da influência do estímulo na transcrição está associado às características específicas dos diazotróficos. Por exemplo, na presença de amônia a expressão da nitrogenase é mais sensível em bactérias diazotróficas de vida livre do que em bactérias simbióticas (HELBELIB; LUDDEN 2000). Outros fatores proeminentes na regulação são os íons metálicos necessários para a atividade da nitrogenase (Fe e Mo) e a luz para os organismos fototróficos (BURGMANN 2003). A regulação da FBN em vários organismos pode ocorrer também no nível de pós – tradução. Este mecanismo permite ao organismo de forma rápida e reversível desligar a atividade da nitrogenase e proteger a enzima de elevadas pressões parciais de O₂, ou ajudar a economizar energia em condições limitantes adversas. No entanto o melhor mecanismo descrito para a inativação reversível do complexo nitrogenase é o que envolve ADP- ribosilação da Fe-proteína (*nifH*) (BURGMANN 2003).

A regulação da FBN foi estudada em grande detalhe para *K. pneumoniae*, sendo que nessa e em outras bactérias diazotróficas o gene *rpoN* codifica um fator sigma da RNA polimerase (σ_{54}) alterando as propriedades da RNA polimerase para permitir a ligação aos promotores *nif* em comum (*rpoN*-dependentes) (figura 1). No entanto, a transcrição do operon ocorre apenas na presença da proteína *nifA*, uma proteína ativadora de transcrição do *nifHDK* (TRIPLETT et al., 1989; MERRICK 1992; DEIXON et al., 1995; HELBELIB; LUDDEN 2000; BURGMANN, 2003). A expressão do *nifA* é, por sua vez, regulada pelos produtos dos genes *ntrBC*, que são parte do sistema *ntr*, um sistema de regulação global que detecta o status de N na célula (TRIPLETT et al., 1989; MERRICK 1992). Adicionalmente, em *K. pneumoniae* o gene *nifL* é cotranscrito e atua como regulador negativo do gene *nifA* (HELBELIB; LUDDEN 2000).

Os mecanismos de regulação em outros organismos podem ser muito diferentes daqueles observados em *K. pneumoniae* (TRIPLETT et al., 1989; MERRICK 1992), como é o caso de *Rhizobium* (HALBLEIB; LUDDEN 2000). Nestes casos existem os genes *fix* e *nod*, que não possuem homólogos no organismo

modelo assimbiótico *K pneumoniae* ou em outras bactérias diazotróficas de vida livre (DEAN; JACOBSON 1992). Os genes *fix* estão envolvidos no transporte de elétrons para a regulação da holoenzima nitrogenase (TRIPLETT et al., 1989; DEAN; JACOBSON 1992). Em *Rhizobium meliloti*, a expressão do *nifA* ocorre em resposta para *fixL* e *fixJ*, que codificam dois componentes que atuam em resposta aos conteúdos de oxigênio (BURKE et al., 2002). Este sistema aparentemente substitui o *ntrBC* encontrado na *K pneumoniae* (figura 1).

Figura 1 - Modelo comparativo de regulação transcricional de genes *nif* em (A) *Klebsiella pneumoniae* e (B) *Rhizobium meliloti*. Fonte: Helbelib; Ludden (2000)

2.1.4 Identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio a partir dos Genes *nif* e rRNA 16S

Zher e colaboradores (2003) observaram maiores distâncias nos agrupamentos baseados nas distâncias genéticas do gene *nifH* em relação ao rRNA 16S, sugerindo que provavelmente o gene *nifH* não é tão conservado como o gene rRNA 16S. De fato existem vários relatos sobre a transferência horizontal dos genes *nifH* e consequentemente agrupamentos filogenéticos equivocados como, por exemplo, o agrupamento de *paenibacillus* e *clostridium* na árvore do gene rRNA 16S mas não na base do gene *nifH*. Um exemplo recente é o agrupamento das cianobactérias não formadoras de heterocistos (*Microcoleus chthonoplastes*), agrupadas como *desulfovibrio* dentro do cluster das *Deltaproteobacterias* (BOLHUIS 2009).

2.1.4 FBN de vida livre

Reed e colaboradores (2011) sugerem quatro linhas fundamentais que desafiam o fato de que as entradas de N por FBN via simbiose supera em muitos ecossistemas a FBN de vida livre. No entanto, muitos ecossistemas têm falta de fixação simbiótica (WOODMANSEE et al., 1981, CREWS 1999, MENGE et al., 2010). Além disso, a presença de plantas simbióticas potencialmente fixadoras de N₂ não é um indicador confiável. Algumas evidências sugerem significativa variação intra-específica nas taxas de FBN de espécies noduladas (GALIANA et al., 2002, SPRENT 2005), e também que as leguminosas nem sempre nodulam em ambientes naturais. Assim, a presença ou ausência de plantas capazes de formar simbioses com bactérias fixadoras de N₂ pode não estar relacionada com as taxas de FBN no ecossistema (BARRON et al., 2011). Outro fator é que as estimativas de FBN simbiótica e de vida livre em larga escala sugerem que, em muitos locais e em alguns biomas, a FBN de vida livre poderia contribuir para uma maior proporção do aporte N e contribuir substancialmente com a FBN global (tabela 1) (CLEVELAND et al., 1999). Finalmente, as taxas de FBN podem variar significativamente dentro de um mesmo lugar. A fixação de N₂ pode ser mais ativa em áreas do ecossistema em que a demanda e as perdas de N são relativamente altas como, por exemplo, na serapilheira em decomposição, onde as altas razões C:N aumentam a demanda de

N (HEDIN, et al., 2009). Reed et al. (2007) observaram em uma floresta tropical, durante o curso da decomposição da serapilheira, a existência de um aumento da FBN de vida livre. Assim, o aporte de N por FBN de vida livre pode ser crítica em determinadas situações como, por exemplo, a decomposição foliar, ou reposição de perdas de N (VITOUSEK et al., 2002; HEDIN et al., 2009).

2.1.4.1 Fatores que influenciam na FBN de vida livre

Dados da literatura sugerem que a fisiologia e estrutura da comunidade de diazotróficos desempenham um papel importante na regulação das taxas de fixação de N nos ecossistemas. As taxas de FBN podem ser potencialmente afetadas por diversos fatores como: temperatura, umidade, concentrações e disponibilidade de P, Mo, N e C (REED et al., 2011). Alguns estudos têm demonstrado também que variações da concentração e disponibilidade de C e P e pH dentro de um mesmo local estão correlacionadas com variações na composição das comunidades diazotróficas e diferenças nas taxas de FBN (NELSON; MELE 2006, HSU; BUCKLEY 2009, TENG et al., 2009, LINDSAY et al., 2010). Assim, a disponibilidade de nutrientes ajuda a regular a FBN de vida livre, mas o papel das comunidades diazotróficas na mediação deste controle permanece em grande parte desconhecido.

Há razões fisiológicas para se esperar limitações na FBN, decorrentes de deficiência de nutrientes devido à alta demanda de P no processo (CLEVELAND; LIPTZIN 2007). Resultados de Barron et al., (2008) demonstram que, na serapilheira de uma floresta tropical do Panamá, aumentos significativos na FBN de vida livre só foram observados quando eram fornecidas fontes de P misturadas com Mo. Esses resultados mostram que, nessa floresta tropical, o Mo é mais limitante para FBN de vida livre do que o P.

Os mecanismos de controle bióticos ou abióticos da FBN de vida livre estão intimamente associados com a funcionalidade do ecossistema, e as taxas de FBN nos mesmos diferem em função da variabilidade da distribuição dos micro-organismos no ambiente e da heterogeneidade espacial dos atributos físicos e químicos, portanto é de se esperar uma grande variabilidade espacial da FBN em florestas (REED et al., 2011).

Em uma floresta de terras baixas da Costa Rica, as taxas de FBN, apresentaram variação substancial ao longo de um gradiente que ia desde o solo até a copa das árvores, com taxas notavelmente mais elevadas na serapilheira e muito mais baixas no solo e no dossel (REED et al., 2008). Os autores argumentam que essas mudanças, além de estarem influenciadas por fatores ambientais, podem também estar associadas à variação espacial das comunidades diazotróficas, dominada por micro-organismos autotróficos na copa e por heterotróficos no solo. Em contraste, em algumas florestas do Hawaí foram reportadas taxas de FBN de vida livre maiores no dossel que no solo, o que poderia estar associadas à maior abundância de líquens no dossel (CREWS et al., 2000; BENNER et al., 2007).

Comumente a distribuição espacial da FBN de vida livre está associada com “Hotspots” de atividade. Hotspots de FBN estão associados normalmente a uma maior diversidade populacional de diazotróficos, mas pode também estar associado a locais mais favoráveis à atividade da nifrogenase (REED et al., 2010).

A frequência e magnitude dos hotspots podem influenciar fortemente nas estimativas das taxas de FBN de vida livre sendo que, muitas vezes, representam uma porcentagem elevada das taxas de fixação total do ecossistema, restringindo as estimativas das taxas de fixação através de tempo e espaço (MCCLAIN et al., 2003).

A influência da variação temporal nas taxas de FBN de vida livre, também é comum. A maioria dos estudos mostra uma notável variação entre as estações do ano (CHAPIN et al., 1991; REED et al., 2007; PEREZ et al., 2004 e 2010; MENGE; HEDIN, 2009; STEWART et al., 2011). Em geral, essas diferenças nas taxas de fixação de N_2 estão associadas à variação da luz, temperatura e precipitação (BENTLEY, 1987). Um exemplo é o aumento das taxas de FBN de vida livre na serapilheira de duas florestas úmidas tropicais da Costa Rica durante épocas de alta pluviosidade (SPRENT; SPRENT, 1990), estimulados provavelmente por mudanças sazonais como, por exemplo, a disponibilidade de água, C lábil, demanda de N, etc.

2.1.4.2 FBN de vida livre em florestas tropicais

As estimativas das taxas de fixação simbiótica de N_2 têm sido numerosas nos ecossistemas terrestres, mas todas representam extrapolações de larga escala do que ocorre em sistemas naturais (CLEVELAND et al., 1999). Em contraste, estimativas publicadas da fixação de N_2 de vida livre são geralmente muito menores. No entanto, as estimativas de fixação de nitrogênio são frequentemente tendenciosas e representam o potencial máximo, ao invés de serem estimativas espacialmente mais realistas na escala de ecossistema (BORING et al., 1988; CLEVELAND et al., 1999; RAYMOND, 2004).

Cleveland e colaboradores (1999) avaliaram as taxas de fixação de N_2 de diazotróficos simbióticos e de vida livre em biomas do mundo, e observaram uma grande variação espacial na contribuição relativa de cada via. Os resultados obtidos indicam que a contribuição relativa da FBN de vida livre varia consideravelmente em cada bioma (tabela1) (REED et al., 2011).

As florestas tropicais são um bom exemplo da importância da FBN de vida livre (SODERLAND; ROSSWALL 1982, CLEVELAND et al., 1999), cujas estimativas sugerem aportes significativos ($> 10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) (JORDAM et al., 1983; REED et al., 2008; CUSACK et al., 2009), muito embora a maioria dos estudos tenham se concentrado na fixação simbiótica. Nos ecossistemas onde a FBN simbiótica é pouco freqüente, a FBN de vida livre seria a origem mais provável do aporte de N (DICKSON; CROCKER 1953; STEVENSON 1959; BORMANN et al., 1977; BORMANN et al 1993.; JHONSON; TODD 1998).

Existem relatos indicando que florestas maduras de várzea mantêm suficiente aporte de N, embora apresentem baixa abundância de leguminosas. Em contraste, apresentam altas taxas de FBN por cianobactérias na superfície das folhas do dossel e do sub-bosque da floresta (GOOSEM; LAMB 1986, CARPENTER 1992, FREIBERG 1998).

Em seis espécies arbóreas de uma floresta madura de terras baixas da Costa Rica em condições de campo foram encontradas taxas de FBN de aproximadamente $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ quando somados os valores do dossel, serapilheira e solo, por espécie arbórea. Foi observada uma alta FBN na serapilheira de cada uma das espécies arbóreas em comparação ao solo e às folhas. No entanto, a leguminosa *Schizolobium parahybum* não apresentou o mesmo padrão de comportamento,

evidenciando taxas de FBN baixas em comparação às das outras espécies. Esse comportamento foi associado a sua composição altamente solúvel e de rápida degradação. Os resultados desse estudo sugerem significativa influência de processos biogeoquímicos nas taxas de FBN nos diferentes substratos avaliados. REED et al., (2008).

Cusack e colaboradores (2009) compararam a FBN por diazotróficos de vida livre em florestas tropicais de diferentes altitudes em Porto Rico. Os resultados mostraram taxas de aproximadamente $12,3 \pm 2,7 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ nas florestas de terras baixas, e $8,4 \pm 1,4 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ nas florestas de altitude mais elevada, indicando que a FBN por diazotróficos de vida livre é um processo ativo nas florestas tropicais úmidas e é dependente da altitude na qual a floresta está localizada.

Estudos sobre a dinâmica das comunidades microbianas diazotróficas mostram a importância da estrutura no funcionamento dos ecossistemas (HUTSON 1997; HOOPER et al., 2005). Em uma floresta tropical de terras baixas na Costa Rica, a composição e diversidade de comunidades de bactérias diazotróficas de vida livre mostraram ser influenciadas por distintas concentrações de P, sendo que a maior concentração desse elemento promoveu a abundância de diazotróficos e as taxas de FBN. Em contraste, uma menor adição de P influenciou mais na diversidade do que na abundância relativa de diazotróficos. Nesse estudo concluiu-se que a disponibilidade de recursos no ambiente, afeta significativamente a estrutura e atividade das populações diazotróficas (REED et al., 2010)

Tabela 1 - Estimativa das taxas de FBN de vida livre e simbiótica em nível de Bioma, baseada na literatura^a

BIOMA	TAXAS DE FIXAÇÃO DE N ₂ DE VIDA LIVRE (Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	FAIXA DAS TAXAS DE FIXAÇÃO DE N ₂ DE VIDA LIVRE (Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	<i>n</i>	FAIXA DAS TAXAS DE FIXAÇÃO DE N ₂ SIMBIOTICA (Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	<i>n</i>
Tundra úmida e tundra alpina	1,5	0,4 - 0,3	7	1,0 - 4,9	3
Floresta boreal	1,2	0,3 - 3,8	14	0,3 - 6,6	2
Floresta temperada	1,7	0,01 - 12	38	1 - 160	17
Campos de regiões temperadas	4,7	0,1 - 21	13	0,1 - 10	8
Savana tropical	15,0	3 - 30	3	3 - 90	6
Floresta tropical perenifólia	7,8	0,1 - 60	19	5,5 - 16	4
Várzea tropical	7,5	4,1 - 12	3	14-28,5	2
Floresta tropical caducifólia	3,3	3,3	1	7,5 -30	3
Floresta mediterrânea de bosques e arbustos	1,0	1,0	1	0,1-10	4
Deserto	4,0	0,01 - 13	15	0,7 - 29,5	3

Fonte: Reed et al., 2011^a Valores médios ou faixas de fixação de N₂, representado por *n* Lugares por bioma

2.1.4.3 Diversidade de bactérias diazotróficas de vida livre em florestas tropicais

A composição das comunidades microbianas é importante na regulação dos processos nos ecossistemas (BALSER; FIRESTONE 2005; WALDROP; FIRESTONE 2006; REED 2007; MARTINY 2006; STRICLAND et al., 2009) e os vínculos entre a estrutura da comunidade microbiana e suas funções têm sido demonstrados em processos do solo, como desnitrificação (CAVIGELLI; ROBERTSON, 2000) e nitrificação (CARNEY et al., 2004). Relações entre comunidades diazotróficas e taxas de fixação de N_2 têm sido estudadas em solos temperados (MOSEMAN et al., 2009), sistemas de desertos (YEAGER et al., 2004) e em terras agrícolas (HSU; BUCKLEY 2009), porém os vínculos entre a comunidade de diazotróficos de vida livre e as taxas de FBN continuam sendo pouco estudados em ecossistemas de floresta (REED et al., 2010).

Comparações da filogenia com base nos genes rRNA 16s e *nifH* revelam aproximadamente as mesmas características. No entanto, a análise com base no gene rRNA 16S nos permite ter uma ampla informação da diversidade do ambiente avaliado e da participação das bactérias diazotróficas dentro da comunidade total. Poly e colaboradores (2001), a partir de número de cópias de genes *nifH*, compararam a população de diazotróficas de solos com diferentes usos na França (floresta, pastagens, outros cultivos), observando resultados similares entre árvores genéticas derivados de gene rRNA 16s e *nifH*. Resposta similar foi observada por Reed et al. (2011) em uma floresta tropical úmida da terras baixas na Costa Rica. Neste estudo também foram estimadas as taxas de FBN por diazotróficos de vida livre e foi evidenciada uma correlação positiva ($p=0,025$) entre a abundância relativa de genes *nifH*, rRNA16S e taxas de FBN.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Descrição das áreas de amostragem

As amostragens foram realizadas na região nordeste do Estado de São Paulo, em duas parcelas permanentes de 1 ha, nos Núcleos Picinguaba (23° 34' S e 45° 02' W) situado no município de Ubatuba, a 100 m de altitude (Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas, parcela E), e Santa Virgínia (23° 17' S e 45° 11' W) situado nos municípios de São Luís do Paraitinga (70%), Cunha (20%) e Ubatuba (10%), à 1000 m de altitude (Floresta Ombrófila Densa Montana, parcela N) no Parque Estadual da Serra do Mar (Figura 2), do projeto Temático Biotá Gradiante Funcional coordenado por Carlos Alfredo Joly (Unicamp) e Luiz Antonio Martinelli (CENA-USP)

Ao longo do gradiente altitudinal os solos são classificados como Cambissolo Háplico Tb distrófico típico (EMBRAPA, 2006). O relevo regional varia de plano à fortemente ondulado com escarpas da Serra do Mar.

O clima no núcleo de Picinguaba é tropical chuvoso, com inverno seco. O mês menos chuvoso tem precipitação inferior a 60 mm. O mês mais frio é julho, com temperatura média de 18,4°C. O mês mais quente é fevereiro, com temperatura média de 25,5°C (Banco de dados Climáticos do Brasil). No núcleo de Santa Virgínia O clima é tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno. A temperatura média da região é de 21°C, com máxima de 27°C e mínima de 12°C. A temperatura média do mês mais quente superior a 22°C (CEPAGRI, 2011) e a média do mês mais frio é superior aos 18°C. (KOPPEN, 1948).

Figura 2 - Localização dos Núcleos Picinguaba (parcela E) e Santa Virgínia (parcela N) do Parque Estadual da Serra do Mar, no Estado de São Paulo. Fonte: Joly et al., (2012)

Figura 3 - Precipitação pluviométrica mensal (mm) e temperatura mensal (°C) registrada no PESH – FOD de terras baixas (Picinguaba) e PESH - FOD Montana (Santa Virgínia) nos meses de amostragem durante os anos 2009, 2010 e 2011. Fonte: SINDA INPE estações 30887 (Picinguaba), 30892 (Santa Virgínia)

Figura 4 - Mapas com a localização das plantas amostradas nas parcelas permanentes do Parque Estadual da Serra do Mar. **A.** F. O. Densa Montana, Núcleo de Santa Virgínia - Parcela N. **B.** F.O. Densa de Terras Baixas, Núcleo de Picinguaba – Parcela E. Os números correspondem à orientação na distribuição das sub-parcelas de 10x10 m, dentro das parcelas do Projeto BIOTA Gradiente Funcional.

2.2.2 Amostragem

Foram amostradas filosfera, dermosfera do caule e solos sob a copa de *Euterpe edulis* (Arecaceae) e *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) (tabela2), as quais apresentam presença na F.O Densa de Terras Baixas e na F. O. Densa Montana (figura 4). Adicionalmente foram amostradas filosfera e solo sobre a projeção da copa de *Merostachys neesii* (Poaceae) na F.O Densa Montana pelo fato da densidade populacional dessa espécie ser elevada nessa floresta.

Realizaram-se amostragens das árvores em duas épocas: janeiro e setembro de 2010, correspondendo a meses de alta e baixa pluviosidade (verão e

inverno, respectivamente). Foram coletadas amostras de 48 indivíduos de cada espécie em cada área e época do ano, totalizando 268 amostras.

Tabela 2 - Descrição das espécies vegetais amostradas no Parque Estadual “SERRA DO MAR”.

N. científico	Nome vulgar	Descrição	Observações
<i>Euterpe edulis</i> Mart.	palmito juçara	Arvore de até 20 m de altura. Perenifolia (LORENZI.1992). Folhas alternas, com até 3 m de comprimento (CK AGRÍCOLA). Possui tronco reto e cilíndrico. Entre o término do tronco e a parte onde nascem as folhas, há uma seção verde mais grossa que o tronco. Dentro desta seção encontra-se a parte comestível da palmeira (CK AGRÍCOLA).	Apresenta estirpe única, sendo incapaz de produzir perfilhos, o que acarreta na morte da planta após corte do palmito (TSUKAMOTO FILHO et al., 2001). Ocorre no estrato médio da Floresta Ombrófila Densa. Desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul. Com distribuição preferencial ao longo do litoral brasileiro, no domínio Florestal Tropical Atlântica. (REIS et al., 2000a).
<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	louro-branco	Árvore de até 14m com ramificação dicotômica, folhas simples, alternas-espíraladas a opostas (ELTINK. 2008). Perenifoliada (Poeta, 2004). Seus frutos têm um dos mais altos conteúdos de proteínas (28.4 %) descritos até o momento (JORDANO, 1993).	Distribuída na Amazônia, Caatinga, Cerrado e especialmente comum na Mata Atlântica (MORELLATO et al. 2000), na Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Restinga e Manguezais.
<i>Merostachys neesii</i> Rupr	bambu	Plantas perenes, lignificadas, eretas e arqueadas no ápice, rizomas paquimórfos. Colmos até 10 m de altura, 1.6–3.2 cm de diâmetro, entrenós com até 30 cm de comprimento. Folhas dos colmos com bainhas tardiamente decíduas lanceoladas (DA MOTA et al., 2009)	Endêmica do Brasil, nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica. Distribuída no Nordeste e Sudeste (São Paulo; Rio de Janeiro). (DA MOTA et al., 2009)

As amostras de dermosfera (superfície da casca) foram coletadas a um metro do solo, com uma área aproximada de 5x30 cm para cada indivíduo (Figura 5A). As amostras de solo foram coletadas sob a projeção da copa após a remoção da serapilheira em anéis de PVC de 3,5 cm de diâmetro, a uma profundidade de 10 cm (Figura 5B). As amostras de filosfera foram compostas de 30 folhas (em *E. edulis* foram amostrados os folíolos) de cada planta distribuídas em três ramos, a uma altura aproximada de 8m, retiradas com auxílio de podão e tesoura de poda (Figura 5C).

Uma parte das amostras foi processada no local de amostragem para determinar a atividade da nitrogenase *in situ*, e o restante encaminhado para o laboratório e armazenado, a 4°C para análises químicas, e a -80°C para análises moleculares. Todas as amostras usadas para a determinação da atividade da nitrogenase após da incubação foram secas em estufa durante 48 horas à 65°C, para estimar a porcentagem de umidade.

Foi feita também a determinação da atividade de nitrogenase na serapilheira e no solo não associado às plantas das 100 sub-parcelas de cada área de estudo no inverno do ano 2009, verão de 2010, verão e inverno do 2011. A área de amostragem da serapilheira foi de 25x25 cm² e no solo em anéis de 2,5 cm de diâmetro e 3 cm de altura (figura 5D).

A amostragem de solo e serapilheira foi realizada por duplicata para um total de 1600 amostras de solo e 1600 de serapilheira correspondentes às 4 amostragens.

Figura 5 - Coleta das amostras de Dermosfera (A), Solo sob a copa (B), filosfera (C) solo não associado a plantas e Serapilheira (D)

2.2.3 Análises químicas de solo sob a copa das árvores estudadas

As amostras de solo foram secas em estufa a 60 °C, moídas e peneiradas em malha de 2 mm. Sua caracterização química foi feita 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 (M.O.) fez-se pela oxidação a CO_2 por íons dicromato em meio ácido, e posterior análise colorimétrica. Os elementos fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) 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 potássio (K) foi extraído do solo através de solução Mehlich e seu teor determinado por fotometria de chama. A capacidade de troca catiônica total (T) foi determinada pela soma dos cátions Ca, Mg, K, H+Al. Os valores da soma de bases trocáveis (SB) foram obtidos pela soma dos valores de Ca, Mg e K. A porcentagem de saturação por bases (V) foi determinada pela razão entre a soma das bases trocáveis (SB) e valor de T.

2.2.4 Determinações da razão isotópica do $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e determinação de C e N total

O material (solo sob a copa, folhas e superfície da casca) foi primeiramente seco na estufa a 65°C por 48 horas e depois moído a pó fino. Do material previamente preparado, pesou-se amostras de solo sob a copa de 13 a 15 mg, superfície da casca (dermosfera) de 3,0 a 3,5 mg e folha de 2,0 a 2,5 mg, acondicionadas em cápsulas de estanho. Essas cápsulas foram introduzidas num analisador elementar (Carlo Erba. EA 1110. CHNS. CE Instruments), que por combustão determina a concentração de N e C total. O gás proveniente da combustão foi purificado numa coluna de cromatografia e introduzido diretamente num espectrômetro 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 internacionalmente reconhecido, através da equação (2):

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

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

2.2.5 Determinação da atividade da nitrogenase por redução de acetileno (ARA) e transformação para taxas de FBN

A atividade da nitrogenase foi determinada pela técnica de redução de acetileno (ARA), que estima indiretamente a atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (C_2H_2) para etileno (C_2H_4) (SCHINNNER et al., 1995). Nas plantas, serapilheira e solo, cada amostra (aproximadamente 200 gramas de solo, 3,5 gramas de casca (dermosfera), 1-10 gramas de folhas de cada árvore, e 10 g de serapilheira), foi selada em um vidro de 250 ml. Em seguida retirou-se um volume de 10% de ar do vidro, e injetou-se o mesmo volume de acetileno correspondente. Todas as amostras foram incubadas por 12 horas no mesmo local da coleta a temperatura ambiente. Após a incubação, retirou-se 10% do volume do ar do frasco que foi armazenado em frascos de penicilina previamente lacrados a vácuo.

A concentração de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, injetando-se 1 mL de amostra no cromatografo Thermo Scientific, equipado com um detector de ionização por chama (250°C) e uma coluna N Poropak (120°C ; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.). Controles negativos foram utilizados a partir da injeção de amostras não incubadas com acetileno, solo, folhas, casca (dermosfera) e serapilheira.

As taxas de redução de acetileno foram calculadas em nanomoles de acetileno reduzido por grama de massa seca, por hora de incubação, Representadas pela equação (3):

$$\text{nmol etileno} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ms h}^{-1} = \frac{(A-C) \cdot V \cdot P \cdot 100}{MA \cdot \text{ml} \cdot R \cdot T \cdot t \cdot \% \text{ ms}} \quad (3)$$

Onde A= quantidade de etileno obtido na amostra após incubação (nl). C = quantidade de etileno em frascos não incubados. V =volume “headspace” nos frascos de incubação. P = pressão de ar sob condições padrão (101300 Pa). MA = massa inicial da amostra (g). ml= quantidade de amostra injetada no cromatógrafo gasoso (1 ml). R = gás constante ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$). T = temperatura de incubação. t = tempo de incubação. $100\%^{-1} \text{ ms}$ = fator para matéria seca

A transformação para quantidade de N fixado foi feita através da relação teórica 3:1 (HARDY, 1968), indicando a fixação de um mol de NH_3 , por três de C_2H_4 formadas. Representada pela equação (4):

$$\text{N}_2 \text{ fixado} = \frac{\text{nmol etileno} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ms} \cdot \text{h}^{-1}}{3} \times 28 \quad (4)$$

Onde: 28 é a massa molecular do N_2 e 3 o fator de conversão. ms= matéria seca. (Os dados podem ser extrapolados por área de amostragem e/ou estação do ano).

As taxas de N fixado, tanto em filosfera, dermosfera e solo sob a copa foram expressas em $\text{ng de N} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. No solo não associado às árvores e na serapilheira em $\text{Kg de N ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$

2.2.6 Análise da diversidade bacteriana

2.2.6.1 Desalojamento dos micro-organismos da filosfera e dermosfera

Sob condições assépticas, dependendo da área foliar, entre 10 e 12 folhas de *M. neesii* e *G. opposita*, e folíolos de *E. edulis*. Aproximadamente 20 gramas de superfície da casca (dermosfera) de cada indivíduo foram colocadas em um Becker contendo 500 mL de solução tampão de lavagem, (solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0) previamente autoclavada e sonicadas por 10 minutos a 22,5 kHz num homogenizador de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA). A solução tampão contendo a suspensão bacteriana foi filtrada a vácuo utilizando-se uma membrana Millipore com porosidade de 22 µm. Posteriormente as amostras foram armazenadas a - 20°C até o processo de extração de DNA.

2.2.6.2 Extração de DNA

O DNA total do solo foi extraído de 0,25 g de cada amostra, utilizando-se o kit Power Soil DNA MoBio (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total celular removido das folhas e cascas (dermosfera) foi extraído a partir da membrana filtrante com a suspensão de células bacterianas, utilizando kit “Fast DNA spin filter (MP Biomedicals, Solon, USA), conforme as instruções do fabricante.

A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris, Ácido Acético e EDTA) e depois corado com “SYBR Green” (Life Technologies. São Paulo, Brasil). A aquisição da imagem dos géis fez-se utilizando um densitômetro storm (GE Healthcare, São Paulo Brasil) e analisadas pelo programa Image Quant TL (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria UV utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA / USP, São Paulo, Brasil).

2.2.6.3 Amplificação do gene rRNA 16S por PCR para pirosequenciamento

A partir do DNA *metagenômico*, foi amplificado um fragmento de 270-300 pb na região V4 do gene rRNA 16S. Na reação de PCR foi usado o primer forward 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') provido de um adaptador para pirosequenciamento. O primer forward recebeu também uma sequência barcode com um MID de 8 pares de bases (no total foram usados 12 MID de forma repetitiva para identificação das 134 amostras sequenciadas). Na mesma reação usou-se uma mistura de 4 primers reversos 820R (Tabela 3) (JESUS et al., 2010). Esta mistura visa amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra a ser analisada, como descrito no *Ribosomal Data Project* (RDP).

A reação de PCR foi realizada em solução contendo: 5,0 µL de solução tampão para PCR 1X; MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 2,5 mM, 3U de Taq DNA polimerase high-Fidelity (Invitrogen, São Paulo, BR), 10 pmol de cada primer, e entre 5 e 15 ng de DNA total, água ultra pura esterilizada para um volume final de 50 µL.

Em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf do Brasil, São Paulo, BR) realizou-se a amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16s nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento à 57°C por 1 minuto e 45 segundos, extensão a 72°C durante 4 minutos, e extensão final à 72°C durante 4 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Os produtos de PCR foram sequenciados pela empresa *Helixxa* (Campinas, São Paulo, Brasil), onde foram purificados (beads AMPure-Agencourt), quantificados novamente (Picogreen, Invitrogen) e pirosequenciados em pirosequenciador GS FLX Titanium (Roche 454 GS-FLX System).

Tabela 3 - Primers usadas na PCR na amplificação do gene rRNA 16s para pirosequenciamento (JESUS et al., 2010).

Identificação	Sequências (5'-3')		
	ADAPTADOR	MID	PRIMER
520F-MID1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	AGAGAGAG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	ATGAGAAG	AYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG	CATCTCAG	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
820R-1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG		TACCRGGGTHCTAATCC
820R-2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG		TACCAGAGTATCTAATTC
820R-3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG		CTACDSRGGTMTCTAATC
820R-4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG		TACNVGGGTATCTAATCC

2.2.7 Análises de sequências

As análises das sequências foram realizadas no programa MOTHUR versão 1.21.1 (SCHLOSS et al., 2009). Antes das análises as sequências referentes aos *tags* iniciadores foram excluídas do banco de dados. As sequências válidas foram alinhadas usando como referência o alinhamento da plataforma silva (silva.bactéria.fasta). Depois do alinhamento as sequências foram checadas quanto a presença de quimeras. Posteriormente foi calculada a matriz de distância pelo método de comparações de pares ("pairwise distance").

Com as sequências limpas foi feita a classificação taxonômica dos *reads*. As sequências foram agrupadas em UTOs e afiliadas a grupos taxonômicos específicos considerando-se 97% de similaridade, utilizando o algoritmo "nearest neighbor". Depois de se obter esses dados foram calculadas as estimativas

dos índices de riqueza de espécies (ACE e Chao1) e diversidade (Shannon e recíproco de Simpson). A partir desses dados foram construídos os diagramas de Venn, as curvas de rarefação e foi determinada a cobertura de amostragem.

As comparações múltiplas entre as bibliotecas do gene rRNA 16S foram realizadas utilizando-se a variância molecular (AMOVA). Essa análise usa o teste de Monte Carlo para a avaliação das diferenças entre cada comunidade (SCHLOSS 2008).

2.2.8 Análise estatística

Para determinação da diferença na atividade da nitrogenase (ARA), $\delta^{15}\text{N}$, umidade, C, N, e C:N, realizaram-se análises de comparação de médias (*t-test*) utilizando-se o programa Sigma Plot versão 11.0. A influência de variáveis abióticas sobre a atividade da nitrogenase foi analisada por meio de análise canônica de correspondência pelo teste de permutação de Monte Carlo no programa CANOCO para Windows. Nos programas R e primer 5 fez-se a análise no métrico dimensional (NMDS) para avaliar a distância entre as amostras de acordo com sua similaridade, tanto nas estimativas da atividade de nitrogenase, como na abundância relativa de bactérias detectadas neste estudo.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização química dos solos estudados

Os solos das áreas estudadas são caracterizados por serem ácidos e distróficos em ambas as localidades de coleta. O pH apresenta valores menores que 4,0. Baixos teores de Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , CTC efetiva (t) e porcentagem de saturação de bases (V%) muito baixas (tabela 4).

A diferença de P sobre a copa de *E. edulis* apresentada entre altitudes corrobora com o trabalho de Martins (2010), que observou maiores conteúdos desse elemento a 1000m de altitude (PESM-Santa Virginia) em comparação a altitudes menores ao longo do gradiente altitudinal entre 0 e 1000 m de altitude (PESM-Picinguaba). Essa maior concentração pode ser consequência de um maior acúmulo de material orgânico em superfície, ocasionando maior liberação de P. Tanner et al., (1998) afirmaram que em florestas tropicais Montana a limitação por N é mais comum do que a limitação por P, enquanto que em florestas tropicais de terras baixas há limitação por P. Os solos de terras baixas são antigos e erosionados com esgotamento dos minerais primários de P (TIESSEN et al., 1994b; CREWS et al., 1995), já a disponibilidade de N é afetada pelas taxas de decomposição da matéria orgânica, processo afetado pela temperatura e consequentemente mais rápido em florestas de terras baixas do que em florestas de Montana (VITOUSEK; SANFORD 1986).

Os resultados sugerem solos de baixa fertilidade, do ponto de vista agrícola. No entanto, nesse ambiente atuam mecanismos diferenciados de economia de nutrientes entre as espécies, somados a considerável efeito da constante deposição e decomposição de detritos orgânicos sobre o solo (MARKEWITZ et al., 2001). O alto conteúdo de matéria orgânica destes solos ($> 50 \text{ g.dm}^{-3}$ - tabela 4), poderia estar influenciando na exuberância biológica deste bioma, em função forte inter-relação com quase todas as características físicas, químicas e biológicas do solo (ALLISON 1973; CAMPBELL 1978).

Tabela 4 - Atributos químicos do solo sob a copa das árvores amostradas em cada área de coleta

	PESM-Picinguaba Parcela E		PESM-SantaVirginia Parcela N		
	<i>E. edulis</i>	<i>G. opposita</i>	<i>E. edulis</i>	<i>G. opposita</i>	<i>M. neesii</i>
pH	3,78±0,19a	3,71±0,12a	3,54±0,09a	3,58±0,21a	3,59±0,11a
M.O. (g.dm ⁻³)	55,59±13,70a	60,37±20,01a	81,42±23,77a	82,00±30,69a	82,23±23,24a
P (mg.dm ⁻³)	1,47±1,37b	2,39±1,41a	3,14±1,93a	2,67±1,90a	3,14±2,10a
K (mmolc.dm ⁻³)	1,64±0,37a	1,24±0,77a	1,93±0,77a	1,97±0,44a	1,54±0,74a
Ca (mmolc.dm ⁻³)	0,22±0,24a	0,22±0,23a	0,01±0,03b	0,20±0,20a	0,10±0,11ab
Mg (mmolc.dm ⁻³)	0,25±0,12a	0,38±0,25a	0,27±0,10a	0,36±0,12a	0,24±0,09a
H+Al (mmolc.dm ⁻³)	124,50±37,24b	146,00±46,27ab	197±45,95a	193,83±62,72a	186,42±68,21a
Al (mmolc.dm ⁻³)	1,26±1,07a	1,81±0,49a	2,41±0,30a	2,38±0,74a	1,89±0,91a
SB (mmolc.dm ⁻³)	2,11±0,62a	1,84±1,10a	2,21±0,82a	2,54±0,66a	1,89±0,85a
T (mmolc.dm ⁻³)	126,61±37,31b	147,84±46,86b	199,21±46,43a	196,37±63,17a	188,32±68,85a
t (mmolc.dm ⁻³)	3,05±1,35b	3,66±1,38ab	4,62±0,91a	4,92±1,22a	3,78±1,22ab
m (%)	36,28±19,59a	52,86±13,59a	53,74±12,57a	47,99±7,18a	48,83±18,21a
V (%)	1,79±0,82a	1,22±0,58ab	1,11±0,41b	1,36±0,37b	1,01±0,36b
S (mg.dm ⁻³)	20,74±10,53a	18,78±3,66a	19,51±10,35a	21,88±9,00a	14,04±3,99 ^a
Fe(mg.dm ⁻³)	202,29±116,28b	194,80±70,52b	312,00±74,40a	196,66±90,54b	235,14±76,74ab

Os valores representam a média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais dentro da mesma linha não diferem significativamente (t - test.; p≤0,05). SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, K, H+Al). T – capacidade de troca catiônica total. t- capacidade de troca catiônica efetiva. m(%)- Saturação de Al- V (%)-Saturação de bases

Em sistemas naturais a decomposição da MOS é a maior fonte de nutrientes (CHEN et al., 2003). Os solos estudados apresentaram menor conteúdo de C sobre a copa de *E. edulis* no núcleo de Picinguaba, no entanto, os teores de C são, de modo geral, considerados altos (tabela 6). É provável que o fornecimento de nutrientes ao solo venha em maior parte da vegetação via serapilheira do que pelo material de origem (HERRERA, 1985).

Martins (2010) observou menor quantidade de serapilheira acumulada sob o solo a 100 m (PESM-picinguaba) do que a 1000 m (PESM-Santa Virginia), indicando que, a maior temperatura e precipitação influenciam na rápida decomposição, isso foi refletido em valores mais altos da relação C:N aos 1000 m. Neste estudo houve similar comportamento na relação C:N com valores maiores em Santa Virginia do que em Picinguaba, no entanto, menores que 20, indicando boa decomposição da MOS (KILLHAM, 1994) nas duas áreas de coleta.

2.3.2 Atividade da nitrogenase ao longo do perfil vertical das árvores

Os resultados deste estudo, tanto a 100 m (PESM-Picinguaba) como à 1000m (núcleo de Santa Virginia) de altitude indicam uma significativa variação de FBN ao longo do perfil vertical das árvores. Em geral, os valores médios de ARA foram de aproximadamente 2778 nmol etileno. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na dermosfera (218,23 ng N $\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), 548 nmol etileno. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na filosfera (27,60 ng N $\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) e 19 nmol etileno. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no solo, (1,39 ng N $\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) (figura 6, tabelas 5 e 9). Dentro desses parâmetros, também houve diferenças entre as espécies arbóreas e as localidades de amostragem. Os maiores valores de ARA na dermosfera se apresentaram nas plantas alocadas no núcleo de Santa Virginia durante o verão. Na filosfera a maior ARA foi no *M neesii*, já no solo a diferença mais relevante se apresentou sob a copa da *G. opposita* no núcleo de Santa Virginia na época de verão, onde ARA foi significativamente inferior quando comparados todos dados de solo (tabela 5, $p = <0.001$).

Segundo Reed e colaboradores (2008), as altas entradas de N nos ecossistemas por diazotróficos de vida livre estão associadas a características próprias das diferentes espécies arbóreas. Duncan e colaboradores (2009) afirmam que, no longo prazo, a dinâmica na ciclagem do nitrogênio é refletida em nichos

diferentes, criando ecossistemas complexos adaptativos. Assim, a FBN em líquens, briófitas e serapilheira permanece constante no tempo, por estar desconectada do pool de nitrogênio disponível no solo. Lindo e colaboradores (2011) argumentam que a FBN associada a briófitas e epífitas na parte aérea das árvores velhas de antigas florestas pode contribuir para o funcionamento global e produtividade das florestas tropicais de clima temperado. Contudo, um aumento na deposição de N na parte aérea reduz as taxas de FBN no solo da floresta. É possível que a Mata Atlântica tenha um padrão de comportamento similar às demais florestas antigas do mundo em relação à FBN, já que, essa floresta encontra-se estabelecida por quase 70.000.000 de anos (LEITÃO FILHO, 1987). Em musgo coletado dos troncos de árvores com até 8 metros de altura, Cusack e colaboradores (2009) observaram atividade da nitrogenase entre 7,8-11 nmol etileno $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ em floresta de terras baixas, e 3,9-5,6 nmol etileno $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ em floresta Montana. Em florestas boreais, as estimativas no aporte de N por musgos arbóreos oscilam entre 17- 23 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (DELUCA et al., 2002). Apesar da variação das taxas de FBN entre florestas, o aporte total de N é bastante significativo e tem importância fundamental na ciclagem do N.

Os relatos de FBN por microorganismos diazotróficos de vida livre em florestas tropicais úmidas indicam significativa variabilidade entre compartimentos arbóreos. Embora neste estudo a atividade da nitrogenase no solo seja estatisticamente menor em comparação com a dermosfera e a filosfera, a sua contribuição nas entradas de N é considerável, ainda mais se consideramos a baixa abundância e riqueza de espécies leguminosas nas florestas da Mata Atlântica avaliadas neste estudo (JOLY: MARTINELLI, 2008).

Figura 6 - Boxplot dos valores médios de ARA durante o inverno e verão, em solo sob a copa e filosfera do total de indivíduos coletados das espécies: *E. edulis* (Palmito juçara), *G. opposita* (Louro-branco), *M. neesii* (Bambu), e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*. Letras iguais não diferem significativamente (t - test.; $p \leq 0,05$).

2.3.2.1 Atividade da nitrogenase no solo sob a projeção da copa

Os valores médios de ARA oscilaram entre aproximadamente 30 e 15 nmol de etileno $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (tabela 5). No entanto, houve um comportamento diferente no solo sob a copa da *G. opposita* alocada no núcleo de Santa Virginia durante o verão, quando os valores de ARA foram de aproximadamente 4 nmol de etileno $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A atividade da nitrogenase estimada nos solos deste estudo é alta em comparação às florestas tropicais úmidas estudadas por Barron e colaboradores (2008) no Panamá e Cusack e colaboradores (2009) em Porto Rico. Estes autores observaram valores de ARA abaixo de 6 nmol de etileno $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Em um estudo realizado em solos de floresta subtropical da Rússia, Rogozhina e colaboradores (2011) encontraram valores de ARA entre 0,6 – 8710 ng de etileno $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. No entanto, os autores atribuem os resultados à integração de outras variáveis associadas com estado fenológico da vegetação avaliada e a mudanças climáticas sazonais.

Tabela 5 – Atividade da nitrogenase (ARA) nas duas épocas de coleta, em solo sob a copa e filosfera das espécies:

E. edulis, *G. opposita* e *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*.

	SOLO SOB A COPA		DERMOSFERA		FILOSFERA	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
nmol etileno g ⁻¹ h ⁻¹						
PESM-Picinguaba						
<i>E. edulis</i>	17,89±5.36ab	20,28±4,94a	2716,95±1139b	1273,93±219,94c	256,63±108,79b	72,27±22,85bc
<i>G. opposita</i>	18,09±9.70ab	28,74±7,27a	2785,41±811,42b	844,78±350,63c	475,12±132,56b	747.03±236,23ab
PESM-Santa Virgínia						
<i>E. edulis</i>	30,01±19,34a	16,00±5,65ab	10127,04±4448,32a	1664,61±318,69c	197,59±264,32b	109,54±20,36b
<i>G. opposita</i>	4,19±2,48c	21,99±5,33a	8097,43±3253,63a	844,45±366,58c	403,11±194,41b	194,72±68,84b
<i>M. neesii</i>	14,63±4,97b	25,34±8,95a	_____	_____	980,09±199,64a	2164,22±684,38a

Os valores representam a média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas localidades e dentro do mesmo compartimento (filosfera, dermosfera, solo) não diferem significativamente (test; p≤0,05)

De modo geral, a menor atividade da nitrogenase desse estudo foi observada na época chuvosa (verão-tabela 5), apresentando pouco agrupamento entre os pontos de amostragem, principalmente no núcleo de Picinguaba. Já na época seca (inverno) houve um agrupamento dos pontos amostrados principalmente no núcleo de Santa Virginia (figura 7A). O resultado obtido entre as estações poderia estar associado a fatores de diluição (época chuvosa) e concentração (época seca) dos grupos microbianos e de nutrientes em resposta aos níveis de pluviosidade. Os exudatos rizosféricos influenciam no microclima da rizosfera, sendo que altos conteúdos de umidade durante épocas de alta pluviosidade aumentem o pH da rizosfera por efeito de diluição e como consequência afeta a biomassa e atividade das comunidades microbianas (SHILPKAR et al., 2010).

O solo sobre a copa da *G. opposita* foi o mais influenciado pela sazonalidade. Este comportamento poderia estar associado à dinâmica desta espécie na movimentação de N. Segundo dados reportados por Aidar e colaboradores (2003), a principal forma de N que esta espécie transporta na seiva do xilema durante a estação seca é o NO_3^- , e a baixa concentração de outros compostos nitrogenados no xilema, sugere que estes podem ser pouco assimilados pela raiz. Isso permite-nos inferir que a planta pode requerer mais da FBN para assimilação de N.

A atividade da nitrogenase no solo sob a copa de *E. edulis* e *M. neesii* não apresentou diferenças entre as épocas. Wickstrom e colaboradores (2007), na avaliação da atividade da nitrogenase da rizosfera de 18 plantas com 89% de resposta positiva, concluíram que a FBN de vida livre é mais influenciada pelos compostos associados à rizosfera de cada planta do que pelas propriedades do solo.

Os organismos fixadores de N_2 podem ser afetados por uma ampla variedade de fatores bióticos e abióticos como, por exemplo, C, N, C:N, umidade (REED et al., 2011). Para avaliar a influência dessas variáveis na atividade da nitrogenase nas duas altitudes (PESM - Picinguaba e PESM - Santa Virginia) e estações (verão e inverno), foi realizada a análise de escala multidimensional (NMDS). O resultado (figura 7A) indicou um fraco agrupamento entre amostras da mesma altitude, sem separação entre as estações, nem entre as espécies arbóreas. Romagnoli (2011) encontrou separação nas mesmas áreas de coleta deste estudo, quando avaliou a estrutura de comunidades de diazotróficos de vida livre, entre

outras comunidades associadas ao ciclo do nitrogênio, sugerindo estruturas de comunidades bacterianas distintas em cada área amostrada.

Tabela 6 - Concentração de C (%), N(%) e relação C:N na camada 0,10m do solo sobre a copa de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii*, durante as duas épocas de coleta.

	<i>E. edulis</i>		<i>G. opposita</i>		<i>M. neesii</i>	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PESM-Picinguaba						
C (%)	4,15±0,22b	3,27±0,28c	4,67±0,39ab	5,26±0,90ab	_____	_____
N (%)	0,33±0,01bc	0,28±0,02c	0,38±0,02b	0,40±0,04b	_____	_____
C:N	12,36±0,20b	11,69±0,19b	12,30±0,33b	11,79±0,38b	_____	_____
PESM-Santa Virginia						
C (%)	5,34±0,34a	4,73±0,33ab	5,59±0,72a	5,91±0,49a	5,66 ± 0,60a	6,53±1,07a
N (%)	0,38±0,068b	0,36±0,02b	0,39±0,04b	0,42±0,02ab	0,37 ± 0,01b	0,44±0,05a
C:N	13,97±0,44a	12,84±0,25b	13,77±0,59ab	13,71±0,40ab	13,74± 0,26ab	14,11±0,50a

Os valores representam à média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas locações e dentro do mesmo atributo (C, N, C:N,) não diferem significativamente (t - test.; p≤0,05)

Para complementar a interpretação dos dados foi aplicada uma análise de correspondência canônica (CCA), incluindo os dados como variáveis ambientais ARA, C, N, C:N e umidade (Tabelas 4, 5, 6), e as espécies arbóreas sob as quais as amostras de solo foram coletadas, como variáveis nominais. Os dados foram representados em um gráfico biplot com 66,66% da variabilidade explicada pelas variáveis ambientais, sendo 86% explicado no primeiro eixo (Figura 7B). A distribuição dos dados no gráfico responde principalmente aos fatores ARA (p=0,0060) e a relação C:N (p=0,010), demonstrando no eixo 1 a separação entre maioria dos dados em PESM – Santa Virginia (verão e inverno), e o inverno em PESM - Picinguaba. Da mesma forma que na NMDS, observa-se a dispersão dos dados de verão em PESM - Picinguaba principalmente no solo sob a *G. opposita*.

A influência da relação C:N na distribuição das amostras reflete a diferença desse atributo entre as localidades de amostragem, com teores relativamente mais

altos no núcleo de Santa Virginia do que em Picinguaba (tabela 6), explicado pela diminuição na taxa de decomposição da matéria orgânica, devido a queda de temperatura causada pelo aumento de altitude (SIMAS et al., 2005; SOUSA NETO, 2008).

Figura 7 – A) Comparação de distâncias entre as amostras de solo sob a copa de *E. edulis* (palmito juçara), *G. opposita* (louro - branco) e *M. neesii* (bambu) durante o inverno e o verão através da análise de escalonamento multidimensional (NMDS) com base nas variáveis: ARA, C, N, C:N e umidade. B) Associação entre as variáveis: ARA, C, N, C:N e umidade das amostras de solo sob a copa de *E. edulis* (palmito juçara), *G. opposita* (louro - branco) e *M. neesii* (bambu) durante o inverno e o verão através da análise da análise de correspondência Canônica (CCA)

2.3.2.2 Atividade da nitrogenase na filosfera

Os valores de ARA na filosfera das plantas avaliadas oscilaram entre 76,93 e 2086,25 nmol etileno g⁻¹ h⁻¹, (tabela 5), sendo que, os valores mais altos se apresentaram na espécie *M. neesii* e menores em *E. edulis*. Os resultados obtidos neste estudo são muito altos quando comparados com os obtidos em uma floresta de Porto Rico estudada por Cusack e colaboradores (2009), onde os valores de ARA em filosfera foram inferiores a 0,25 nmol etileno g⁻¹ h⁻¹. Segundo Reed e colaboradores (2008), as estimativas de ARA no dossel das florestas úmidas tropicais são muito discrepantes, sugerindo que a notável variação responde a atributos bioquímicos próprios da filosfera de cada espécie arbórea. O resultado deste estudo corrobora essa característica, pois, a análise NMDS mostrou um significativo agrupamento (stress 0.03) entre as espécies arbóreas (figura 8A). Resultado similar foi relatado por Furnkranz e colaboradores (2008) na filosfera de três espécies de plantas em uma floresta tropical úmida da Costa Rica, onde houve variação das taxas de FBN entre as plantas. Os resultados podem estar relacionados com a seleção entre plantas e bactérias como reportaram Lambais e colaboradores (2006) na filosfera de diferentes espécies arbóreas da Mata Atlântica.

Um fator de grande importância na FBN foliar é a habilidade de colonização por bactérias diazotróficas, cuja eficiência responde principalmente à capacidade de usar as fontes de carbono da planta hospedeira. Bactérias como *Pseudomonas* sp. têm a capacidade de modificar o ambiente da filosfera, aumentando a umidade com compostos tensoativos e permitindo solubilização e difusão de substratos (WILSON; LINDOW, 1994). Cusack e colaboradores (2009) sugerem que a FBN pode também ser influenciada por materiais de difícil decomposição, causando um efeito negativo quando o C é de difícil acessibilidade. Essa poderia ser uma das causas da menor atividade da nitrogenase em *E. edulis*, espécie que possui a maior relação C:N (Tabela 7). No entanto, existem outros fatores associados à fisiologia da filosfera e à capacidade de colonização das bactérias diazotróficas em relação à disponibilidade de carbono, sendo que este elemento, às vezes fica acumulado na estrutura microscópica da superfície foliar, estômatos, células epidérmicas e diferentes camadas de cera (LEVEAU, 2001). Na filosfera deste estudo o C não influenciou na

variabilidade dos resultados, sendo essa variabilidade explicada num 25,42% por os valores de ARA ($p=0,020$) e o teor de N ($p=0,020$), (Figura 8B).

A *G. opposita* diferiu das outras espécies na concentração de N. Essa planta é caracterizada por possuir alto conteúdo de proteínas principalmente nos seus frutos (AIDAR 2003; OLIVEIRA 2009). Alta quantidade de nitrogênio foliar foi reportada também por Campos (2009) nessa espécie arbórea.

Figura 8 – A) Comparação de distâncias entre as amostras da filosfera de *E. edulis* (palmito juçara), *G. opposita* (louro - branco) e *M. neesii* (bambu) durante o inverno e o verão através da análise de escalonamento multidimensional (NMDS) com base nas variáveis: ARA, C, N, C:N. B) Associação entre as variáveis: ARA, C, N, C:N das amostras da filosfera de *E. edulis* (palmito juçara), *G. opposita* (louro - branco) e *M. neesii* (bambu) durante o inverno e o verão através da análise de correspondência Canônica (CCA)

Tabela 7 – Concentração de C (%), N(%) e relação C:N na filosfera de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii*, durante as duas épocas de coleta

	<i>E. edulis</i>		<i>G. opposita</i>		<i>M. neesii</i>	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PESM-Picinguaba						
C(%)	45,04±0,361a	43,65±0,24b	40,84±0,34c	39,37±0,22d	_____	_____
N(%)	2,56±0,10c	2,46±0,16c	4,52±0,13a	3,64±0,18b	_____	_____
C:N	17,88±0,80a	18,24±0,89a	9,11±0,31e	11,14±0,65d	_____	_____
PESM-Santa Virginia						
C (%)	42,81±0,72b	44,49±0,39ab	41,01±0,67bc	41,33±0,20bc	41,50±0,36bc	41,80±0,46bc
N(%)	2,55±0,07c	2,24±0,06c	3,92±0,15b	4,05±0,13b	2,80 ±0,10c	2,77 ± 0,07c
C:N	16,87±0,60b	20,01±0,66a	11,14±0,83d	10,27± 0,34d	14,95 ± 0,45c	15,20 ± 0,47c

Os valores representam à média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas localidades e dentro do mesmo atributo (C,N,C:N,) não diferem significativamente (t - test.; p≤0,05)

2.3.2.3 Atividade da nitrogenase na dermosfera

Tem-se demonstrado via FBN, um importante fornecimento de N em líquens, algas e musgos colonizados por *cianobactérias* (MENGE, 2009). Alguns estudos em cianolíquens coletados em dermosferas de árvores da Alaska relatam valores de ARA de 200 (DENISON, 1973), 12330 (BECKER, 1980), entre 232 e 781 (GUNTHER, 1989), 61,5 em líquens e 30 nmol de $C_2H_4 \text{ cm}^{-2}h^{-1}$ em musgos da Nova Zelândia (MENGE, 2009).

Os dados de ARA na dermosfera das plantas deste estudo oscilaram entre 844,45 e 10127,04 nmol etileno $g^{-1} \cdot h^{-1}$, sendo que, os valores mais altos se apresentaram durante o verão (época chuvosa) na espécie *E. edulis* alocada no núcleo de Santa Virginia e os menores em *G. opposita* (tabela 5).

Cook; Russell (1983), a partir de dados pluviométricos e evaporação sugerem que condições de umidade para a FBN permanecem favoráveis por longos períodos nos meses mais úmidos, quando as temperaturas também são as mais favoráveis, pois pequenas mudanças na temperatura podem influenciar na atividade da enzima nitrogenase (MENGE, 2009).

Existem relatos de limites na temperatura para atividade da nitrogenase associados à diversidade de bactérias diazotróficas. Englund (1978) encontrou maior

ARA a temperaturas de 39°C do que a 20°C em *Nostoc-Microcoleus-Schizothrix* e *Stigonema* no Brasil. Na Nigéria, *Scytonema* não apresentou atividade da nitrogenase em temperatura de 0°C, no entanto, os resultados foram ótimos entre 25-30°C.

Zielke e colaboradores (2002), em condições controladas, observaram baixas e constantes taxas de ARA entre 0 e 10°C, um incremento acima dos 10°C, e nível máximo entre 25-32°C para cianobactérias associadas a musgos, e após 40°C a atividade da nitrogenase caiu para zero, indicando que existe uma faixa para a atividade da enzima.

Neste estudo as temperaturas durante os dias de amostragem foram: 21°C - 25°C (núcleo de Picinguaba) e 18°C - 21°C (núcleo de Santa Virginia), durante o verão e o inverno respectivamente. Como dito anteriormente, houve maiores valores de ARA no núcleo de Santa Virginia ($p < 0,05$) tanto para *E. edulis* como para *G. opposita* na época de verão (tabela 5). Possivelmente houve melhor resposta tanto aos maiores valores de temperatura como à hidratação originada pela maior pluviosidade dessa época. Segundo Benalp (2002) a flutuação da umidade e dessecação, pode levar a uma maior FBN nas condições de alta pluviosidade. Lindo e colaboradores (2011) estudando a contribuição de N associada a briófitas da dermosfera de árvores de uma floresta temperada de Vancouver, observaram uma redução de 82% nas taxas de FBN em épocas de baixa umidade e temperaturas maiores a 30°C. Os autores não identificaram o fator de maior influencia nos resultados. Segundo akinsoji, (1991) a umidade é considerada como o fator mais importante para a colonização da microflora sob a dermosfera das árvores, sendo que nas florestas tropicais úmidas as árvores criam na superfície da dermosfera microhabitats muito úmidos. Possivelmente, neste estudo a resposta da atividade da nitrogenase em PESM – Santa Virginia, durante a época chuvosa (verão) esteja relacionada com esse comportamento, decorrente da constante umidade causada pela densa neblina que cobre quase diariamente essa região (JOLY et al., 2012)

A análise NMDS (figura 9A) agrupou os dados das duas parcelas durante a época de inverno. Já as amostras do verão ficaram dispersas, refletido também no gráfico biplot da figura 9B. Nessa figura a distribuição dos dados explica 17% da variabilidade dos resultados, significativa unicamente para ARA ($p = 0,020$), indicando que as variáveis abióticas consideradas na análise (C, C:N, N) não influenciaram a FBN na dermosfera.

Figura 9 – A) Comparação de distâncias entre as amostras da dermosfera de *E. edulis* (palmito juçara) e *G. opposita* (louro - branco) durante o inverno e o verão através da análise de escalonamento multidimensional (NMDS) com base nas variáveis: ARA, C, N, C:N. B) Associação entre as variáveis: ARA, C, N, C:N das amostras da dermosfera de *E. edulis* (palmito juçara) e *G. opposita* (louro - branco) e *M. neesii* (bambu) durante o inverno e o verão através da análise de correspondência Canônica (CCA)

Tabela 8 – Concentração de C (%), N(%) e relação C:N na dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*, durante as duas épocas de coleta

	<i>E. edulis</i>		<i>G. opposita</i>	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PESM-Picinguaba				
C (%)	42,96±1,28bc	42,73±0,87bc	46,74±0,86ab	42,97±1,00bc
N (%)	2,91±0,10ab	2,66±0,10b	3,27±0,16a	2,65±0,10b
C:N	14,71±0,71c	16,33±1,00bc	14,71±1,00c	18,38±1,03a
PESM-Santa Virginia				
C (%)	44,71±0,71b	40,98±0,75c	47,44±0,78a	45,49±1,59ab
N (%)	2,60±0,12b	2,75±0,18b	2,55±0,08b	2,51±0,51b
C:N	17,56±1,00ab	15,55±1,20bc	18,74±0,66a	18,20±0,88a

Os valores representam à média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas localidades e dentro do mesmo atributo (C, N, C:N,) não diferem significativamente entre si (t - test.; p≤0,05)

2.3.3 Concentração e variação do ^{15}N ao longo do perfil vertical das árvores

O $\delta^{15}\text{N}$ da planta pode ser usado para determinar se a fonte de N é predominantemente de origem atmosférica ou oriunda do solo (MARTINS, 2010).

O N_2 é considerado como substância padrão para análises isotópicas de nitrogênio e apresenta $\delta^{15}\text{N}$ igual a zero ‰. No fracionamento isotópico durante o processo de FBN o valor de $\delta^{15}\text{N}$ é desprezível e próximo de zero (DOMINGUES, 2005).

É difícil afirmar que exista FBN apenas através do uso da abundância natural de ^{15}N , já que, o $\delta^{15}\text{N}$ está relacionado com o tempo de residência do N de todo o ecossistema (HIETZ et al., 2002). No entanto, considerando o parâmetro utilizado por Sampaio (2009), valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre 0 e 2 ‰ sugerem que parte do N é originado da FBN.

Neste estudo, ao longo do perfil das árvores houve valores do $\delta^{15}\text{N}$ mais próximos de zero na dermosfera (-0,45 - 1,25), seguido pela filosfera (1,20 – 4,00) e o solo sob a copa com os valores mais altos (4,58 - 6,20) (anexo A) concordando com os dados de ARA (tabela 5) que indicam maior FBN na dermosfera e menor no solo sob a copa. A sazonalidade influenciou na variação do $\delta^{15}\text{N}$ do solo sob a copa e a dermosfera das plantas do PESM-Picinguaba e a filosfera das duas localidades (figura 10).

Figura 10 – Comparação de $\delta^{15}N$ em solo (A) e filosfera (B) do total de indivíduos coletados das espécies: *E. edulis* (Palmito juçara), *G. opposita* (Louro - Branco), *M. neessii* (Bambu), e dermosfera (C), nas duas primeiras espécies mencionadas. Os valores representam a média (n = 10), desvio padrão. Letras iguais dentro do mesmo compartimento (filosfera, dermosfera, solo) não diferem significativamente (t - test; $p \leq 0,05$)

2.3.3.1 Variação no $\delta^{15}\text{N}$ do solo sob a copa

O N dos solos apresenta $\delta^{15}\text{N}$ (‰) médio de +7‰, com exceção de solos de florestas, cujos valores $\delta^{15}\text{N}$ (‰) estão ao redor de +1‰ (YONEYAMA, 1996). Os solos de florestas tropicais são muito mais enriquecidos em ^{15}N do que os de florestas temperadas, com valores médios superiores a 8‰ (MARTINELLI et al., 1999). Valores similares foram encontrados por Nardoto (2005) na Bacia Amazônica Brasileira. Na Mata Atlântica, solos estudados por Martins (2010) apresentaram menor enriquecimento em ^{15}N , com valores próximos de 6‰. Esses valores são similares aos encontrados neste estudo, onde o solo do núcleo Picinguaba apresentou os valores mais elevados (figura 10). Segundo Martins (2010), o maior enriquecimento nesse solo está associado ao alto teor de argila, concordando com Nardoto e colaboradores (2008), que verificaram que solo com 95% de argila em Manaus-platô era mais enriquecido em ^{15}N do que o solo com 65% de areia em Manaus-baixo. Isso poderia ser decorrente das diferenças na ciclagem de N, influenciado pelo tipo de solo e o tipo de vegetação.

Neste estudo, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (anexo A) do solo sob a copa das árvores avaliadas não indicam a existência de alta atividade de FBN. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ observados no núcleo de Picinguaba indicam maior possibilidade de que durante a época seca (inverno) parte do aporte de N (tabela 6) seja via FBN, concordando com a maior atividade da nitrogenase nessa época. Já no núcleo Santa Virginia não se observou relação entre os valores $\delta^{15}\text{N}$ e atividade da nitrogenase, como também não houve relação com os conteúdos de N no solo. Situação similar foi reportada por Rodriguez e colaboradores (2003) em solos da Espanha. Não se pode afirmar que a variação no $\delta^{15}\text{N}$ observada nesse estudo seja principalmente devido à FBN, já que os mecanismos de fracionamento de N no solo ainda não são bem entendidos (ADAMS; GRIERSON, 2001), e o fracionamento isotópico pode acontecer em resposta a outros fatores, dentre eles a oxidação incompleta de NH_4^+ mineralizado, enriquecendo zonas do solo em que o íon amônio fica retido (KARAMANOS; KENNIE, 1980).

2.3.3.2 Variação no $\delta^{15}\text{N}$ foliar

As plantas geralmente são menos enriquecidas em ^{15}N do que o solo. Isto está relacionado com a absorção do N mineral que é empobrecido em ^{15}N , pois os processos de transformação do N orgânico nas diferentes formas de N inorgânico pelos micro-organismos do solo (mineralização, nitrificação e denitrificação) favorecem a assimilação do isótopo de N mais leve (^{14}N) (KAHMEN, 2008).

A variação do $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas avaliadas neste estudo (anexo A) estão dentro da média $\delta^{15}\text{N}$ reportada para florestas tropicais ($3,7 \pm 3,5 \text{ ‰}$) por Martinelli e colaboradores (1999). Houve diferença sazonal ($P < 0,05$) do $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas de *E. edulis* e *M. neesii*, e os valores mais elevados foram observados na época chuvosa (verão). Nessas plantas, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ observados no inverno ($< 2,0 \text{ ‰}$) sugerem aporte do N via FBN, principalmente em *M. neesii* que apresentou valores baixos de $\delta^{15}\text{N}$ nas duas épocas de amostragem. A espécie *G. opposita* no núcleo Santa Virginia teve comportamento inverso às demais espécies arbóreas em relação à sazonalidade. No núcleo Picinguaba, da mesma forma que Campos (2009), não foi observada diferença significativa no $\delta^{15}\text{N}$ entre as épocas do ano, mas houve um grande acúmulo de nitrogênio nas folhas desta espécie, principalmente durante o verão (tabela 7).

É difícil afirmar qual é a fonte principal do N para *G. opposita*. No entanto, de acordo com o observado por Campos (2009), a planta apresenta um baixo conteúdo de nitrato foliar, sugerindo que grande parte do N seja procedente de FBN. Vários estudos têm reportado a relação entre o N fixado por bactérias da filosfera e o novo N da folha hospedeira (BENTLEY; CARPENTER 1984, LINDO, 2011). Bentley e Carpentier (1984) observaram em cianobactérias uma transferência entre 10-25% do N fixado para a planta hospedeira. (*Welfia georgii*).

2.3.3.3 Variação do $\delta^{15}\text{N}$ na dermosfera

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ observados neste estudo estiveram entre $-0,45$ e $1,25 \text{ ‰}$ (anexo A). Valores similares foram encontrados por Hietz e colaboradores (2002) na avaliação da abundância natural de ^{15}N na parte aérea (plantas epífitas, dermosfera,

solo aéreo, folhas, biofilme foliar) de 9 árvores não leguminosas de uma floresta Montana na Costa Rica.

Neste estudo, durante a época chuvosa (verão), o conjunto de dados de *G. opposita* alocada no núcleo Picinguaba, corresponde às entradas de N provavelmente associadas à FBN, já que foram observados valores baixos de $\delta^{15}\text{N}$ (anexo A), maior ARA (tabela 5) e alto conteúdo de N na dermosfera (tabela 8).

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de todas as árvores estiveram abaixo de -2‰ , sugerindo que grande quantidade de N das amostras (tabela 8) venha da FBN, contrastando com o solo onde o conteúdo de N (tabela 6) foi muito menor, enquanto a atividade da nitrogenase indicou também a menor FBN entre os três compartimentos avaliados.

2.3.4 Influência da variabilidade espacial na estimativa de taxas de FBN de vida livre

De modo geral, os dados obtidos indicam maior FBN na serapilheira do que no solo coletado no grid das parcelas amostradas (anexo B). Os valores médios das taxas de FBN no solo oscilaram entre 0,53 e 8,44 kg N ha⁻¹ano⁻¹ e na serapilheira entre 3,25 e 29,10 kg N ha⁻¹ano⁻¹. Foi observada maior FBN no solo durante a amostragem em época de maior pluviosidade (Verão, 2010) tanto no núcleo de Picinguaba como em Santa Virginia. Já na serapilheira não houve essa tendência (figura 11). Resultados similares foram reportados por Reed e colaboradores (2007), para dois tipos de solos e na serapilheira coletada na superfície dos mesmos em uma floresta tropical úmida da Costa Rica, em quatro épocas do ano. Nesse estudo, as maiores taxas de FBN foram detectadas nas épocas de maior pluviosidade. No entanto, os autores encontraram uma fraca correlação entre a umidade e as taxas de FBN apenas na serapilheira ($R^2 = 0,12$), sugerindo que, possivelmente, a sazonalidade influencia na FBN por fatores que não estão associados exclusivamente à umidade.

Figura 11- Estimativas de taxas de FBN em solo e serapilheira no PESM - Picinguaba (A), PESM-Santa Virginia (B), e precipitação pluviométrica mensal (mm) nas épocas de amostragem. Letras iguais nas duas localidades e dentro do mesmo substrato (solo, serapilheira) não diferem significativamente (test: $p \leq 0,05$)

Os resultados da serapilheira obtidos de quatro coletas realizadas nas épocas de inverno e verão durante dois anos refletem uma grande variabilidade espacial nas taxas de FBN. Nas figuras 12 e 13, observa-se também que as áreas com maior FBN não são coincidentes nas diferentes épocas de amostragem, indicando a existência de variabilidade temporal. Esse comportamento pode estar associado a alterações na estrutura das comunidades de diazotróficas e à composição química do meio. O grau de decomposição dos resíduos vegetais limita a disponibilização de nutrientes da MOS, o que também afeta a comunidade microbiana (PROSSER, 2004).

Cleveland e colaboradores (2011), avaliando a FBN na serapilheira de *Cryptomeria japonica* coletada em duas localidades, demonstraram que a atividade dos diazotróficos depende das taxas de decomposição do material orgânico associado às espécies arbóreas. Os autores observaram aumento na atividade de FBN após 16 e 19 meses de incubação da serapilheira, o que pode ser explicado pela mudança na qualidade da serapilheira durante a decomposição.

Figura 12 – Estimativas de FBN durante o inverno e verão na serapilheira (A) e o solo (B) das 100 sub-parcelas da parcela E no núcleo de Picinguaba. A0 indica o início da parcela e J9 o final. A linha vermelha dentro da escala indica a média das taxas de FBN

Figura 13 – Estimativas de FBN na serapilheira (A) e no solo (B) das 100 sub-parcelas da parcela N no núcleo de Santa Virginia. A0 indica o início da parcela e J9 o final. A linha vermelha dentro da escala indica a média das taxas de FBN

Na serapilheira amostrada para este estudo houve predomínio de folhas de *M. neesii* (bambu) na época seca (inverno) de 2009, resultando na mais alta estimativa de FBN ($29,10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), quando comparadas todas as amostragens, sugerindo maior atividade de diazotróficos nesta espécie vegetal. Esses resultados foram confirmados para estimativas de FBN na filosfera da planta, que apresentou a maior taxa de FBN entre as espécies avaliadas (tabela 9).

A figura 14 apresenta a densidade de colmos de *M. neesii* em toda a parcela N no núcleo de Santa Virginia. Os pontos de maior densidade de colmos de *M. neesii* coincidem com as áreas de maior entrada de luz na parcela (PADGURSCHI, 2010), o que poderia estar estimulando a atividade de bactérias fotossintéticas diazotróficas. A menor FBN encontrada nas folhas da serapilheira em relação às folhas das árvores (tabela 9, anexo B) é possivelmente em decorrência da diminuição na concentração de nutrientes, pois, alguns deles são removidos das folhas antes da senescência (YAMANAKA et al., 2011). Nesse caso, é importante levar em consideração o predomínio de diazotróficos heterotróficos na serapilheira e sua maior dependência da composição da matéria orgânica (VITOUSEK et al., 2000).

Figura 14 – Densidade de colmos de *M. neesii* na parcela permanente N do núcleo de Santa Virginia-PESM. Fonte: Padgurschi, (2010)

Os resultados obtidos nas amostras do solo ao longo das parcelas indicam menor FBN quando comparada com as amostras coletadas sob a copa das árvores (tabela 9, anexo D), o que sugere influência dos exudados rizosféricos na atividade de bactérias diazotróficas de vida livre.

Tabela 9 – Taxas de FBN ($\text{ng de N}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) em solo sob a copa e filosfera de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*

Espécie vegetal	SOLO SOB A COPA		DERMOSFERA		FILOSFERA	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PESM-Picinguaba						
<i>E. edulis</i>	1,25±0,37ab	1,09±0,34a	169,05±70,05b	79,26±13,68b	7,46±3,03b	1,01±0,38bc
<i>G. opposita</i>	1,26±0,67ab	1,60±0,50a	178,91±50,48b	52,56±21,81b	27,24±7,20b	33,61±12,52ab
PESM-Santa Virginia						
<i>E. edulis</i>	2,09±1,35a	1,25±0,39ab	630,12±27,28a	103,57±19,83b	6,60±2,58b	2,20±0,53b
<i>G. opposita</i>	0,49±0,17c	1,05±0,37a	503,84±202,44a	52,54±22,81b	28,57±14,39b	4,40±2,24b
<i>M. neesii</i>	1,10±0,34b	1,77±0,62a	_____	_____	69,56±14,81a	90,92±42,94a

Os valores representam a média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas localidades e dentro do mesmo compartimento (filosfera, dermosfera, solo) não diferem significativamente (t - test; $p \leq 0,05$)

De modo geral, os valores obtidos tanto no solo como na serapilheira ao longo das parcelas indicam grande variabilidade espacial na parcela permanente, sugerindo a existência de condições estimulantes para a atividade de diazotróficos em função de condições ambientais não conhecidas.

Reed e colaboradores (2010), tentando identificar possíveis ligações entre as taxas de FBN e composição de comunidades diazotróficas de vida livre, compararam a abundância das comunidades microbianas e as taxas de FBN em 40 amostras de serapilheira fertilizadas com diferentes concentrações de P. Os resultados mostraram diferenças na estrutura das comunidades bacterianas em cada um dos tratamentos, indicando que mudanças em pequena escala da composição de comunidades diazotróficas poderiam explicar a maior atividade localizada de FBN, concluindo que os hotspots de FBN não refletem só a heterogeneidade de variáveis abióticas, como também, em muitos casos, a dinâmica da comunidade fixadora de N_2 . Esses resultados demonstram a importância da estrutura das comunidades microbianas na regulação e função dos ecossistemas.

2.3.5 Comunidades bacterianas associadas a espécies de arbóreas

A partir de 134 amostras coletadas (48 de solo sob a copa, 48 de filosfera e 38 de dermosfera), foram obtidas inicialmente um total de 521970 sequências através do pirosequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S. Após da remoção das quimeras o número de sequências válidas foi de 423210, com tamanho médio de 216 bases. Essas sequências foram agrupadas em 35216 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), com 97% de similaridade, obtendo entre 91-96% de cobertura de amostragem (figura 15, tabela 10).

A comparação múltipla entre as bibliotecas, através de AMOVA, mostrou diferenças significativas entre os três compartimentos das árvores (dermosfera-filosfera-solo sob a copa, $p < 0.001^*$). Portanto, pode-se dizer que cada compartimento possui uma comunidade bacteriana única.

Figura 15 - Curvas de rarefação de bactérias em solo sob a copa (A) e filosfera (B) de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* e dermosfera (C) em *E. edulis* e *G. opposita*, indicando o número estimado de UTOS obtidos pelo pirosequenciamento do gene rRNA 16S. O cálculo foi realizado no mothur (SCHLOSS et al., 2009)

Tabela 10 - Estimativa de riqueza e diversidade de UTOs em amostras de filosfera e solo sob a copa de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii*, dermosfera em *E. edulis* e *G. opposita*

Compartimento	Espécie arbórea	Índice de riqueza		Índice de diversidade			
		n seqs ^a	UTOs ^b	Ace ^c	1/D ^d	Shannon ^d (H')	Cobertura de amostragem
Filosfera	<i>M. neesii</i> (PESM-Santa Virginia)	24740	2909	22050,6 (21048; 23108)a	24,1 (23,5; 24,8)	4,7 (4,7; 4,7)b	91%
	<i>G. opposita</i> (PESM-Picinguaba)	35646	2457	14566,2 (13874; 15299)b	19,1 (18,7; 19,5)	4,1 (4,1; 4,2)ef	95%
	<i>G. opposita</i> (PESM-Santa Virginia)	25744	2200	10901,5 (10358; 11480)b	27,9 (27,2; 28,6)	4,5 (4,5; 4,6)c	95%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Picinguaba)	28823	2002	11030,4 (10444; 11656)b	15,5 (15,2; 15,9)	3,9 (3,9; 3,9)g	95%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Santa Virginia)	28823	1878	9047,1 (8553; 9577)c	16,4 (16,1; 16,7)	3,9 (3,9; 3,9)g	96%
Dermosfera	<i>G. opposita</i> (PESM-Picinguaba)	27545	2916	16925,7 (16170; 17724)a	32,2 (31,4; 33,1)	4,8 (4,8; 4,8)a	92%
	<i>G. opposita</i> (PESM-Santa Virginia)	24329	2181	14823,6 (14072; 15622) b	30,4 (29,6; 31,1)	4,6 (4,5; 4,6)c	94%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Picinguaba)	33011	3053	16058,9 (15365; 16791)a	29,4 (28,7; 30,1)	4,8 (4,8; 4,8)a	94%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Santa Virginia)	27972	2688	14454,4 (13785; 15163)b	30,5 (29,8; 31,3)	4,8 (4,7; 4,8)ab	93%
Solo sob a copa	<i>M. neesii</i> (PESM-Santa Virginia)	35869	2828	17001,1 (16239; 17806)a	15,5 (15,2; 15,9)	4,2 (4,2; 4,3)de	94%
	<i>G. opposita</i> (PESM-Picinguaba)	31403	2757	15314,8 (14585; 16089)a	15,7 (15,3; 16,1)	4,3 (4,3; 4,3)d	94%
	<i>G. opposita</i> (PESM-Santa Virginia)	26208	2022	10369,7 (9839; 10936)b	18,1 (17,6; 18,5)	4,2 (4,2; 4,3)de	95%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Picinguaba)	30036	2531	16493,1 (15706; 17327)b	13,0 (12,7; 13,3)	4,1 (4,1; 4,2)de	94%
	<i>E. edulis</i> (PESM-Santa Virginia)	43061	2794	13836,1 (13211; 14498)a	18,9 (18,5; 19,2)	4,3 (4,3; 4,3)d	96%

^aNúmero de sequências válidas analisadas por biblioteca, ^bNúmero de Unidades Taxonômicas Operacionais (≥97% similaridade), ^cEstimadores não paramétricos de riqueza de espécies: ACE, ^dÍndices de diversidade: Recíproco de Simpson (1/D) e Shanon, Estimador de máxima semelhança. Valores entre parêntesis representam intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Letras iguais dentro e entre as colunas de índice de riqueza (Ace) e índice de diversidade (Shannon) não diferem significativamente. Os valores representam a somatória de todos os indivíduos analisados para cada espécie (n=10)

O estimador não paramétrico de riqueza de UTOs, ACE, reflete uma diferença significativa entre locais de coleta e os compartimentos das árvores (tabela 10, figura 15), indicando menor riqueza na filosfera em comparação com a dermosfera e o solo, exceto na filosfera de *M. neesii* onde o comportamento foi similar com a dermosfera. Excluindo a dermosfera de *G. opposita* (PESM-Santa Virginia), o índice de Shannon e recíproco de Simpson (tabela 10) indicaram, de modo geral, maior diversidade nesse compartimento e na filosfera de *M. neesii*. No entanto, o índice de Shannon ficou sempre acima de 3,0, sugerindo alta diversidade em todas as mostras (CLARKE; WARWICK, 2001).

A maior diversidade na dermosfera possivelmente esteja relacionada com as epífitas hospedeiras como musgos, líquens e algas presentes nesta estrutura. Vários estudos reportam grande diversidade microbiana associada à microflora que cresce nas dermosfera apoiadas pelas condições ambientais caracterizadas por acumulação de detritos, partículas de solo (canopy soil), umidade (AKINSOJI, 1991; BRAGINA 2012).

O resultado na filosfera de *M. neesii*, poderia estar associado aos nutrientes aportados por essa planta. De acordo com Mailly (1997) num estudo relacionado com o acúmulo de nutrientes em biomassa e serapilheira de várias plantas, o bambu apresentou o maior acúmulo de nutrientes durante uma avaliação de vários anos. Nesse caso, a composição dos nutrientes poderia criar condições para a uma abundante colonização de diversas populações microbianas heterotróficas. No entanto, seria necessária uma caracterização química foliar de *M. neesii*, para associar o componente nutricional com a alta riqueza e diversidade bacteriana desta espécie arbórea.

Embora com índices menores (tabela 10), as filosferas das outras espécies arbóreas também indicaram alta diversidade ($H' = 3,9-4,5$), concordando com Lambais e colaboradores (2006) na observação de uma enorme diversidade de bactérias em filosfera de diferentes espécies arbóreas da Mata Atlântica. No entanto os valores observados neste estudo sugerem uma maior riqueza de bactérias na filosfera, o que pode ser explicado provavelmente pela diferença entre os métodos de sequenciamento (FINKEL et al., 2011).

O solo sob a copa das árvores avaliadas neste estudo apresentou alta diversidade ($H' = 4,1$ e $4,3$ em Picinguaba e Santa Virginia respectivamente), no entanto, foi menos diverso que o solo não associado com as árvores estudado por Lima (2011) que encontrou índices de diversidade de $5,8$ e $6,3$ nos núcleos de Picinguaba e Santa Virginia respectivamente. Os resultados da afiliação filogenética indicaram a presença de 32 filos distribuídos entre as amostras estudadas (figura 16). Em todos os compartimentos, a maior parte da comunidade pertence ao filo Proteobacteria, com (36,6%), os outros filos abundantes foram *Plantomycetes*, *Firmicutes*, *Acidobacterias*, *Bacteroidetes*, *Bacteria incetae sedis* e *Verrumicrobia* (8,82%, 7,86%, 7,48%, 6,26%, 5,95%, 5,83% respectivamente).

Lima (2011), em solo não associado com as árvores, encontrou nos núcleos de Picinguaba e Santa Virginia 29 dos 32 filos encontrados neste estudo. No entanto, as proporções foram diferentes (Acidobacteria 55,9%), (Proteobacteria 13,6%). Provavelmente essa diferença esteja relacionada com a influência das plantas nas comunidades bacterianas. Em solos de uma floresta de Arizona Dunbar (2002) encontrou maior abundância do filo Proteobacteria em solo rizosférico em comparação ao solo não rizosférico onde predominou o filo Acidobacteria

As UTOs obtidas com maior frequência indicam que a comunidade de bactérias desse bioma são influenciadas pela localidade, o qual foi observado nos três compartimentos das espécies arbóreas avaliadas (figuras 17, 18, 19). Na dermosfera se observou também influencia das espécies arbóreas. Esse mesmo comportamento foi observado por Andrade (2007) na dermosfera de sete espécies vegetais da Mata Atlântica.

Figura 16 – Frequência relativa dos filos do domínio Bactéria detectada em filofera e solo sob a copa de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*. As UTOs foram classificados usando *Classifier do Ribosomal Database Project* (limite de confiança de 95%)

Figura 17 – Escala multidimensional (NMDS) das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias detectados na dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita* nos núcleos de Picinguaba (Pc) e Santa Virginia (SV) – PESM. Os dados correspondem aos 800 UTOs obtidos com maior frequência entre as amostras

Figura 18 – Escala multidimensional (NMDS) das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias detectados na filosfera de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* nos núcleos de Picinguaba (Pc) e Santa Virginia (SV) – PESM. Os dados correspondem aos 800 UTOs obtidos com maior frequência entre as amostras

Figura 19 – Escala multidimensional (NMDS) das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias detectados no solo sob a copa de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* nos núcleos de Picinguaba (Pc) e Santa Virginia (SV) – PESM. Os dados correspondem aos 800 UTOs obtidos com maior frequência entre as amostras

As proteobactérias constituem o maior filo de bactérias, que também é o mais diversificado metabolicamente, incluindo quimolitotróficos, quimioorganotróficos e fototróficos. No entanto, a fisiologia e metabolismo de ~80% desse filo de bactérias permanece desconhecido (CHRISTNER, 2012). Neste estudo foram encontrados 430 gêneros de proteobactérias (similaridade $\geq 80\%$). Em nível de classe, houve predominância de Alphaproteobacteria em todos os compartimentos das árvores, com aproximadamente 37,0%, seguido por Gammaproteobacteria com 34,8%. No entanto, pelo interesse do trabalho será realçada a presença de possíveis gêneros diazotróficos de vida livre (13, 3, 7 gêneros de alphaproteobactérias, betaproteobactérias e gamaproteobactérias respectivamente (similaridade $\geq 80\%$)).

Além dos gêneros de proteobactérias possivelmente diazotróficas (figura 21), houve marcada presença de cianobactérias na dermosfera e filosfera em relação ao solo (dermosfera- 46%, filosfera-45%, solo-9,0%) (figura 22).

Embora não existam estudos estimativos das taxas de fixação biológica de nitrogênio por estes micro-organismos na locação de coleta, os resultados obtidos por Gonçalves (2011) na filosfera das mesmas árvores avaliadas neste trabalho indicam predominância de gêneros de cianobactérias com espécies capazes de fixar N₂. Portanto, esse grupo de bactérias é de grande importância na entrada de nitrogênio na Mata Atlântica, principalmente através de associação com líquens (CAMBELL, 2010) e musgos (DELUCA, 2002) hospedados na filosfera e a dermosfera.

Sobre os outros filos encontrados em grande abundância não há informação com relação à sua capacidade de FBN. Talvez sejam necessários mais estudos que permitam identificar outras populações microbianas com essa função. Nas filosfera e dermosfera deste estudo foi abundante o filo *Bacteroidetes*. Hongoh e colaboradores (2008) reportaram a presença de genes codificadores de nitrogenase (*nifHDK*) no filo *Bacteroidetes* encontrado no intestino das Termitas, porém os autores não encontraram explicação devido à inexistência de relatos da presença de genes da nitrogenase nesse grupo de bactérias.

2.3.5.1 Presença de possíveis diazotróficos de vida livre associados com as espécies arbóreas

Além das *proteobactérias* e *cianobactérias*, *firmicutes* foi um dos filos de maior abundância, principalmente no solo sob a copa. Nesse grupo foram detectados três gêneros de possíveis diazotróficos de vida livre (*Paenibacillus*, *Heliobacillus*, *Clostridium*, *Propionispira*). O maior número de UTOs foi apresentado pelas *proteobactérias* (621, 535, 279 em filosfera, dermosfera e solo sob a copa respectivamente), seguido das *cianobactérias* (184, 85, 23 em dermosfera, filosfera e solo sob a copa respectivamente), por último *firmicutes* (40, 32, 20 em solo sob a copa, dermosfera e filosfera respectivamente). Os resultados indicam, de modo geral, uma possível menor presença de diazotróficos de vida livre no solo sob a copa das árvores, em comparação com a dermosfera e a filosfera.

Burgmann (2003) e Reed e colaboradores (2010), através da quantificação de cópias de genes *nifH*, avaliada em conjunto com a atividade da nitrogenase, encontraram uma correlação positiva entre abundância de bactérias diazotróficas e atividade da nitrogenase. Embora nossos dados não correspondam a sequências obtidas pelo gene *nifH*, foi observado um comportamento similar dos possíveis diazotróficos pertencentes ao filo Proteobacteria considerados neste estudo (figura 20) principalmente na filosfera de *M. neesii* (maior taxa de FBN foliar) e o solo (menores taxas de FBN em comparação a filosfera e dermosfera) (tabela 9).

Figura 20 - Distribuição ao longo do perfil das árvores dos números de UTOs de possíveis bactérias diazotróficas de vida livre detectadas pertencentes ao filo Proteobacteria, em filosfera e solo sob a copa de *E. edulis*, *G. Opposita* e *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita* nos núcleos de Picinguaba (Pc) e Santa Virginia (SV) – PESM.

Os resultados sugerem que provavelmente a maior atividade da nitrogenase estimada na filosfera de *M. neesii* e, por conseguinte, maior FBN (tabela 9) esteja possivelmente relacionada com a sua grande riqueza e diversidade de *proteobactérias* diazotróficas, quando comparada com filosferas de *E. edulis* e *G. opposita* (tabela 10, figura 15).

A preferência da filosfera de *M. neesii* como hospedeira dos diversos grupos microbianos ainda precisa ser estudada. No entanto, deve-se considerar que estas plantas crescem em lugares com alta incidência de luz (PADGURSCHI, 2010), favorecendo a colonização de bactérias fototróficas como, por exemplo, do gênero *Rhodospila* (fototrófica anoxigênica), encontrada em maior quantidade nas folhas desta planta (figura 21). Desse gênero só é conhecida a espécie *Rhodospila globiformes* (MADIGAN; IMHOFF, 1984). Uma análise de seis metagenomas filosfericos revelou a presença de uma diversificada comunidade de bactérias fototróficas anoxigênicas. Esse grupo de bactérias tem sido encontrado em cinco filos (Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes e Proteobacteria). A explicação para a presença desses grupos bacterianos baseia-se na utilização de sulfeto fornecido pelas folhas de algumas espécies de plantas (SEKIYA, 1982; ATAMNA-ISMAEEL, 2012).

A maior colonização na filosfera de *M. neesii* por quase todos os gêneros detectados, indica existência mecanismos de seleção específicos os quais precisam ser estudados.

2.3.5.1.1 Predomínio de possíveis diazotróficas de vida livre em nível de classe e gênero dentro do filo das proteobactérias

Os grupos reconhecidos como diazotróficos de vida livre em nível de gênero tiveram predominância dentro da classe Alphaproteobacteria (14 gêneros) e Gamaproteobacterias (8 gêneros). Também foram considerados alguns gêneros das Betaproteobacteria (3 gêneros que apresentaram em média pelo menos uma UTO por amostra). A classe Alphaproteobacteria também foi reportada como mais abundante em musgos *Sphagnum mosses* em uma floresta tropical úmida da Austrália, onde foi estudada a diversidade de diazotróficos através do gene *nifH* e 16S (BRAGINA et al., 2012).

Lima (2012), ao fazer uma estimativa geral dos grupos de bactérias em solos das mesmas áreas deste estudo (Núcleos de Picinguaba e Santa Virginia), também encontrou maior abundância das Alphaproteobacteria, seguido por Gama proteobacteria. Outro estudo realizado por Bruce e colaboradores (2010), em solos de seis localidades da Mata Atlântica, também indicou maior quantidade de Alphaproteobacteria, porém a distribuição desse grupo foi diferente entre os locais de amostragem, indicando influência do local nestas comunidades bacterianas.

A alta incidência de Alphaproteobacterias provavelmente esteja relacionada com a versatilidade desse grupo de bactérias em se adaptar a diversos habitats, desde ambientes estáveis e ricos nutricionalmente, como células eucariotas, até ao solo que é mais variável em qualidade de nutrientes (THIJS et al.,2009). A classe das Alphaproteobacteria abriga um conjunto variado de metabolismos, fenótipos celulares e uma vasta gama de habitats, onde sua interação com as plantas permite encontrá-las em torno das raízes, em tecido aéreo, ou em desenvolvimento de órgãos específicos (nodulação da raiz). Isso permite, de modo geral, estabelecer uma categorização de estirpes como filosféricas, rizosféricas ou endofíticas (PINI et al, 2011).

Como já comentado acima, existe uma grande variação metabólica, não só dentro da classe das Alphaproteobacteria, como também dentro do filo de Proteobacteria. Portanto, com a finalidade de enriquecer os resultados deste estudo, fez-se uma descrição geral de outras funções metabólicas relevantes e/ou ambientes colonizados comumente pelos gêneros de proteobactérias possíveis diazotróficas de vida livre encontradas neste estudo (Tabela 11).

Figura 21 – Número estimado de UTOs de gêneros de possíveis bactérias diazotróficas detectadas pelo programa mothur (SCHLOSS et al., 2009) dentro do filo Proteobacteria, em filosfera e solo sob a copa de *E. edulis*, *G. opposita* e *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita* no PESH-Picinguaba (Pc) e PESH-Santa Virginia (SV)

Tabela 11 - Gêneros de proteobactérias possivelmente diazotróficas de vida livre frequentes nas espécies arbóreas avaliadas

(Continua)		
Bactéria (gênero)	Descrição geral	Abundância nos compartimentos número de (UTOs)
Alphaproteobacteria		
<i>Phenylobacterium</i>	Degradação de compostos xenobioticos (WEON et al., 2008), observada em solos (LINGENS et al., 1985) e musgo sphagnum (BRAGINA et al., (2012)	Filosfera:64 Dermosfera:51 Solo sob a copa:37 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 29
<i>Beijerinckia</i>	O açúcar é um dos melhores alimentos para estas bactérias presentes em diversos solos, principalmente cultivados cana de açúcar (DÖBEREINER et al.,1995).	Filosfera:20 Dermosfera:8 Solo sob a copa:8 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 8
<i>Methylocapsa</i>	Metanotróficas habitantes de diversos ambientes, especialmente oligotróficos, ácidos, altamente empobrecidos em nitrogênio (DEDYSH et al., 2004)	Filosfera:14 Dermosfera:5 Solo sob a copa: 10 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 6
<i>Methylovirgula</i>	Utiliza substratos de carbono reduzidos, sem ligações carbono-carbono como a única fonte de carbono e energia (LIDSTROM, 2006). O metanol é o principal substrato para não metanotróficas que habitam ambientes terrestres, que é produzido por decomposição de material vegetal (ANDER;ERIKSSON 1984; WARNEKE et al., 1999)	Filosfera:44 Dermosfera:5 Solo sob a copa: 12 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 19
<i>Agromonas</i>	Tem a capacidade de crescer em diversos ambientes com baixa quantidade de nutrientes (solo, lagos, oceanos). São eficientes degradadores de matéria orgânica (OTHA; HATTORI 1983)	Filosfera:36 Dermosfera:47 Solo sob a copa: 46 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 17
<i>Rhodopseudomonas</i>	Fototrófica púrpura não sulfurosa, encontrada em ambientes marinhos e solos, têm a capacidade de degradar diversos compostos aromáticos compõem a lignina (CANTERA. et al., 2004)	Filosfera:10 Dermosfera:5 Solo sob a copa:9
<i>Methylobacterium</i>	Utilizam o metanol emitido pelos estômatos das plantas, participam no estímulo da germinação de sementes. Têm sido encontradas em solo, folhas e outras partes das plantas (LIDSTROM; HRISTOSERDOVA 2002). http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Methylobacterium	Filosfera:54 Dermosfera:10 Solo sob a copa:8 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> : 21

Tabela 11 - Gêneros de proteobactérias possíveis diazotróficas de vida livre frequentes nas espécies arbóreas avaliadas

		(continuação)
Bactéria (gênero)	Descrição geral	Abundância nos compartimentos
<i>Methylosinus</i>	Metanotróficas obrigatórias, têm sido encontradas em solo, sedimentos e águas subterrâneas (TOUKDARIANT; LIDSTROM, 1984)	Filosfera:45 Dermosfera:10 Solo sob a copa: 1 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> :23
<i>Pseudoxanthobacter</i>	Apresentam metabolismo aeróbico, têm sido isoladas do solo (ARUN et al., 2008)	Filosfera:20 Dermosfera:29 Solo sob a copa: 13 Maior quantidade na dermosfera de <i>E.edulis</i> PESH- Picinguaba:12
<i>Belnapia</i>	Comuns em ambientes áridos e semi-áridos, criando uma crosta de partículas unida por materiais orgânicos (BENALP, 2002)	Filosfera:10 Dermosfera:12 Solo sob a copa: 14
<i>Rhodopila</i>	Bactérias fotoheterotróficas não sulfurosas. Crescem em lugares com luz e condições anóxicas. Desse gênero sabe-se da existência uma única espécie (<i>Rhodopila globiformis</i>) (MADIGAN; IMHOFF, 1984)	Filosfera:108 Dermosfera:101 Solo sob a copa: 37 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> :36
<i>Swaminathania</i>	Tolerantes ao sal. Solubilizadores de fosfato, isolados da rizosfera e caules do arroz http://nabc.cals.cornell.edu/pubs/nabc_16/talks/Swaminathan	Filosfera:7 Dermosfera:7 Solo sob a copa: 4
<i>Rhodospirillum</i>	Bactérias não sulfurosas. Podem viver em aerobiose ou anaerobiose. Apresentam forte influência da luminosidade nas taxas de FBN, tem ampla versatilidade metabólica. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodospirillum	Filosfera:14 Dermosfera:13 Solo sob a copa:1
<i>Sphingomonas</i>	Associadas com rizosfera e raízes de arroz (CHENGHUI et al; 2006)	Filosfera:32 Dermosfera:35 Solo sob a copa: 6

Tabela 11 - Gêneros de proteobactérias possíveis diazotróficas de vida livre frequentes nas espécies arbóreas avaliadas

		(continuação)
Bactéria (gênero)	Descrição geral	Abundância nos compartimentos
Betaproteobacteria		
<i>Derxia</i>	Podem crescer como autotróficas facultativas do hidrogênio, e fixar N ₂ em aerobiose ou anaerobiose. Comuns em solos tropicais (HUIXIE; YOKOTA 2004)	Filosfera:1 Dermosfera:7 Solo sob a copa: 10
<i>Burkholderia</i>	Grande capacidade na degradação de poluentes pela sua diversidade na utilização de fontes de carbono. Sabe-se da sua associação com raízes de arroz, milho e cana de açúcar.	Filosfera:14 Dermosfera:9 Solo sob a copa: 6 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesi</i> :7
<i>Azospira</i>	De crescimento aeróbico, têm sido isolados a partir da superfície de gramíneas como capim e arroz (BAE et al., 2006)	Filosfera:13 Dermosfera:6 Solo sob a copa: 4
Gamaproteobacterias		
<i>Klebsiella</i>	Anaeróbica facultativa. Têm sido isoladas do solo. Sabe-se da sua participação no máximo desenvolvimento radicular na cultura de arroz promovida pela síntese de hormônios como o Ácido Indol-acético (EL-KHAWAS; ADACHI, 1999)	Filosfera:9 Dermosfera:9 Solo sob a copa: 0
<i>Methylococcus</i>	Várias espécies desse grupo são metanotróficas obrigatórias (MURREL; DALTON 1983)	Filosfera:41 Dermosfera:44 Solo sob a copa: 74 Maior quantidade no solo sob a copa de <i>E. edulis</i> PESH- Santa Virginia:21
<i>Azomonas</i>	Podem ser heterotróficas ou quimioautotróficas. Fixam nitrogênio em baixa condições aeróbicas (CAPONE, 1998)	Filosfera:41 Dermosfera:34 Solo sob a copa:2 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesi</i> :13
<i>Azorhizophilus</i> (<i>Azotobacter</i> <i>paspali</i>)	Apresenta associação com as gramíneas como <i>Paspalum notatum</i> , arroz, milho (MOREIRA, 2010)	Filosfera:43 Dermosfera:64 Solo sob a copa:5 Grande quantidade na filosfera de <i>M. neesi</i> :16

Tabela 11 - Gêneros de proteobactérias possíveis diazotróficas de vida livre frequentes nas espécies arbóreas avaliadas

		(conclusão)
Bactéria (gênero)	Descrição geral	Abundância nos compartimentos
<i>Pseudomonas</i>	Crescem em condições de micro-areofilia. Reportadas como ubíquos participantes das comunidades da filosfera (LINDOW et al., 2003)	Filosfera:60 Dermosfera:36 Solo sob a copa: 7 Maior quantidade nas filosfera de <i>M. neesii</i> :17 e PESH-Picinguaba, <i>E.edulis</i> :19. <i>G. opposita</i> : 14
<i>Beggiatoa</i>	Quimiosintetizadoras. Em estirpes de água doce demonstrou a capacidade de crescer heterotroficamente. Têm a capacidade de oxidar sulfeto (H ₂ S) http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Beggiatoa	Filosfera:21 Dermosfera:6 Solo sob a copa: 19 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> :8
<i>Frateuria</i>	Crescem em meio estritamente aeróbico. Têm sido isoladas da parte superficial da raiz de algumas leguminosas (OZAWA et al., 2003)	Filosfera:16 Dermosfera:31 Solo sob a copa: 21 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> :7
<i>Stenotrophomonas</i>	Têm sido encontradas em solos, e em varias plantas (REINHARDT et al., 2008)	Filosfera:22 Dermosfera:9 Solo sob a copa: 7 Maior quantidade na filosfera de <i>M. neesii</i> :9

A informação da abundância de proteobactérias nos compartimentos foi gerada a partir da figura

21

2.3.5.1.2 Cianobactérias detectadas ao longo do perfil das espécies arbóreas

Em comparação com Proteobacteria, a riqueza de *cianobactérias* foi muito inferior (184, 85, 23 UTOs em dermosfera, filosfera e solo sob a copa respectivamente). Contudo, o fato dos resultados da estimativa de taxas de FBN ter tido similar distribuição entre os três compartimentos (maior em dermosfera, seguida pelas filosfera e o solo sob a copa), sugere que esse grupo bacteriano, mesmo em menor quantidade em relação às proteobactérias, pode ter sido de

grande influência na estimativa da atividade da nitrogenase ao longo do perfil das árvores. Furnkranz e colaboradores (2008) através das análises de sequências do gene rRNA 16S encontraram também pouca abundância de *cianobacterias* na filosfera de três espécies de plantas. A explicação desses resultados foi baseada na alta influência da flora epífita sobre a população de cianobactérias, enquanto que, o conjunto de comunidades bacterianas associadas às folhas é altamente diversificado. Nesse estudo foi sugerido que as filosfera colonizadas por epífitas em associação com cianobactérias podem ser de grande importância no aporte de N na floresta avaliada.

A maior quantidade de *cianobactérias* na dermosfera coincide com a maior atividade da nitrogenase neste compartimento. Conforme descrito anteriormente, a amostragem da dermosfera correspondeu principalmente a líquens, algas e musgos hospedeiros do caule das árvores. Os resultados na dermosfera sugerem a existência de associação de *cianobactérias* com musgos e formação de líquens, pois, existem relatos de altas taxas de FBN em associação entre musgos e *cianobactérias* ($2200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{d}^{-1}$) (DELUCA 2002). A presença da *Fischerella* foi reportada como um gênero de *cianobactéria* abundante em dermosfera arbóreas de florestas tropicais (ASTHANA et al., 2006). NEUSTUPA, (2008b) encontrou também grande colonização de cianobactérias na dermosfera de 10 árvores localizadas em uma floresta Tropical do Sudeste da Ásia.

Neste estudo, a abundância de *cianobactérias* na filosfera foi semelhante em todas as espécies arbóreas, coincidindo com o relatado por Furnkranz e colaboradores (2008) na Costa Rica, onde se estimou a atividade da nitrogenase e população de bactérias diazotróficas na filosfera de três espécies arbóreas. Nesse estudo, sugeriu-se que a espécie da planta hospedeira tem pouca influência sobre a diversidade das *cianobactérias*. No entanto, em nível de estrutura das comunidades de *cianobactérias*, Gonçalves (2011) encontrou influência das espécies arbóreas na colonização da filosfera quando comparou seis espécies arbóreas nas mesmas localidades de amostragem deste estudo. Os gêneros de *Cianobactérias* identificados nesse trabalho correspondem à predominância de linhagens capazes de fixar N_2 .

O solo sob a copa das árvores apresentou a menor riqueza de *cianobactérias* e atividade da nitrogenase, quando comparada com a dermosfera

e a filosfera. Provavelmente, as condições desse ambiente sejam menos favoráveis para o seu desenvolvimento. Alguns estudos de solo indicam a intensidade da luminosidade como um fator limitante na fixação de N₂, entretanto, altas temperaturas do ar (> 27°C), baixo teor de umidade e pouca biomassa microbiana poderiam também explicar a baixa atividade da nitrogenase das *cianobactérias* no solo (BENALP, 2002). Contudo, resultados obtidos por Dojani e colaboradores (2007) na detecção de gêneros de *cianobactérias* eficientes na FBN em solos de uma floresta tropical na Guiana Francesa, informam que as *cianobactérias* são de grande importância na entrada de nitrogênio nesse ambiente.

Figura 22 – Distribuição, ao longo do perfil das árvores, dos números de UTOs de possíveis bactérias diazotróficas de vida livre detectadas do filo cianobactérias em filosfera e solo sob a copa de *E. edulis*, *guapira pposita* e *M. neesii* *neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita* nos núcleos de Picinguaba (Pc) e Santa Virginia (SV) – PESM.

3. CONCLUSÕES

As espécies arbóreas amostradas apresentaram incrementos das taxas de FBN na ordem: solo sob a projeção da copa, filosfera e dermosfera respectivamente. No solo não associado com as árvores, as taxas de FBN foram geralmente menores do que na serapilheira, sugerindo que o aporte de N estimado através de FBN depende do substrato onde é determinado e pode estar associado à presença de grupos diazotróficos específicos.

De modo geral, as taxas de FBN na serapilheira e solo apresentam grande variabilidade espacial nas duas áreas amostradas, mas não sugerem uma tendência temporal nas taxas de maior FBN durante as épocas de inverno e verão.

O pirosequenciamento do gene rRNA 16S mostrou que cada compartimento das espécies arbóreas avaliadas possui uma comunidade bacteriana distinta. Na dermosfera, filosfera e solo sob a projeção da copa das árvores amostradas os resultados demonstraram influência do local de amostragem. Na dermosfera os resultados mostraram que a espécie vegetal também influencia na comunidade epifítica.

Os índices de riqueza e diversidade das UTOs sugerem que a dermosfera de espécies arbóreas *E. edulis* e *G. opposita* localizadas em PESM – Picinguaba, possui uma comunidade bacteriana mais rica e diversa do que o PESM – Santa Virginia.

Entre os possíveis diazotróficos observados, o filo Proteobacteria é o grupo dominante entre os três compartimentos avaliados, com predomínio da classe Alphaproteobacteria principalmente na filosfera de *M. neesii*. A presença de cianobactérias foi maior na dermosfera, e Firmicutes no solo sob a projeção da copa das árvores amostradas, sugerindo que a comunidade bacteriana seja altamente diversificada e tende variar espacialmente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.A.; GRIERSON, P.F. Stable isotopes at natural abundance in terrestrial plant ecology and ecophysiology: An update. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 3, n. 4, p. 299-310, 2001.
- AGRITEMPO. **Estação IMET**. Disponível em: <www.agritempo.gov.br/> Acesso em: set. 2011.
- AIDAR, M.P.M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G.R.; JOLY, C. A. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant Cell and Environment**, Logan v. 26, p. 389-399, 2003.
- AKINSOJI, A. Studies on epiphytic flora of a tropical rain forest in Southwestern Nigeria. **Plant Ecology**, Perth, v. 92, n. 2, p. 181-185, 1991.
- ALLISON, F.E. **Soil organic matter and its role in crop production**. Amsterdam: Elsevier, 1973. 589p.
- ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. Methanol formation during lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Munster, v. 21, p. 96–102, 1984.
- ANDRADE, M. R. **Diversidade e biogeografia de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da mata Atlântica**. São Paulo, 2007, 126 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007
- ARUN, A.B.; SCHUMANN, P.; CHU, H.I.; TAN, C.C.; CHEN, W.M.; LAI, W.L.; KAMPFER, P.; SHEN, F.T.; REKHA, P. D.; HUNG, M.H.; CHOU, J.; YOUNG, C.Y. *Pseudoxanthobacter soli* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing alphaproteobacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1571–1575, 2008.
- ASTHANA, R.; SRIVATAVA, A.; SINGH, A.P.; SINGH, S.P.; NATH, G.; SRIVATAVA, R.; SRIVATAVA, B.S. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. Isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. **Journal Applied Phycology**, Perth, v. 18, p. 33-39, 2006.
- ATAMNA-ISMAEEL, N.; FINKEL, O.; GLASER, F.; VON MERING, C.; VORHOLT, J. A.; KOBLÍŽEK, M.; BELKIN, S.; BÉJÀ O. Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. **Environmental Microbiology Reports**, Bedford, 2012, 8p.
- BAE, H.S.; RASH, B.A.; RAINEY, F.A.; NOBRE, M.F.; TIAGO, I.; DA COSTA, M.; MOE, W. Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from Groundwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 889–893, 2006.

BALSER, T.C.; FIRESTONE, M.K. Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. **Biogeochemistry**, Dordrecht v. 73, p. 395–415, 2005.

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, 2008.

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.

BECKER, V.E. Nitrogen fixing lichens in forests of the Southern Appalachian Mountains of North Carolina. **Bryologist**, Boston, v. 83, p. 29-39, 1980.

BELNAP, J. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA, **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 35, p. 128–135, 2002.

BENNER, J.W.; CONROY, S.; LUNCH, C.K.; TOYODA, N.; VITOUSEK, P.M. Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian montane forests. **Biotropica**, Malden, v. 39, p. 400–405, 2007.

BENNER, J.W.; VITOUSEK, P.M. Development of a diverse epiphyte community in response to phosphorus fertilization. **Ecology Letters**, Davis, v. 10, p. 628–36, 2007.

BENTLEY B.L.; CARPENTER E.J. Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plant. **Oecologia**, Marburg, v. 63, 52–56, 1984.

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.

BORING, L.R.; SWANK, W.T.; WAIDE, J.B.; HENDERSON, G.S. Sources, fates, and impacts of nitrogen inputs to terrestrial ecosystems: review and synthesis. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 6, p. 119–159, 1988.

BORMANN F. H; LIKENS G. E. AND MELILLO J. M. 1977 Nitrogen budget for an aggrading northern hardwood forest ecosystem. **Science**, Washington, v. 196, p. 981-983, 1977

BORMANN, B.T.; BORMANN, F.H.; BOWDEN, W.B.; PIERCE, R.S.; HAMBURG, S.P.; WANG, D.; SNYDER, M.C.; LI, C.Y.; INGERSOLL, R.C. Rapid N₂ fixation in pines, alder, and locust: evidence from the sandbox ecosystem study. **Ecology**, Davis, v.74, p.583–598, 1993.

BOLHUIS, H; SEVERIN, I; CONFURIUS-GUNS, V; WOLLENZIEN, U.I; STAL L.J. Horizontal transfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium

Microcoleus chthonoplastes. The ISME Journal, New York, v. 1, p.121-130, 2010.

BRAGINA, A.; BERG, C.; CARDINALE, M.; SHCHERBAKOV, A.; CHEBOTAR, V.; BERG, G. The Sphagnum mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. **The ISME Journal**, New York, v. 6, p. 802-813, 2012.

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, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **SOIL MICROBIOLOGY**, Springer, Verlag, v. 60, p. 840-849, 2010.

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

BURKE, D.J.; HAMERLYNCK, E.P.; HAHN, D. Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1157-1164, 2002.

CAMPBELL, C.A. Soil organic carbon, nitrogen and fertility. In: SCHNITZER, M.; KHAN S.U. (Ed.). **Soil Organic Matter**. Elsevier: Amsterdam, 1978. p. 173-271.

CAMPOS, M.M.S. **Ecofisiologia do Uso de Nitrôgeno em Espécies Arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, São Paulo**. 2009. 102p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Derivation and properties of F-prime factors carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of General Microbiology*, London, v.93, p.111-125, 1976

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

CANTERA, J.J. L.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. The nitrogen-fixing gene (nifH) of *Rhodopseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer?. **Microbiology**, Suita, v. 150, p. 2237–2246, 2004.

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.

CARNEY, K.M.; MATSON, P.A.; BOHANNAN, B.J.M. Diversity and composition of tropical soil nitriWers across a plant diversity gradient and among land use types. **Ecology Letters**, Davis, v. 7, p. 684–694, 2004.

CARPENTER, E.J. Nitrogen fixation in the epiphyllae and root nodules of trees in the lowland tropical rainforest of Costa Rica. **Acta Oecologica**, Paris, v. 13, p. 153-160, 1992.

CASSETARI, A. **Diversidade de bactérias nodulíferas da mata atlântica**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CAVIGELLI, M.A.; ROBERTSON, G.P. The functional signficance of denitriWer community composition in a terrestrial ecosystem. **Ecology**, Davis, v.81, p.1402–1414, 2000.

CEPAGRI - **Portal Oficial do Centro de Promoção da Agricultura**. Disponível em: www.cepagri.gov.mz/ Acesso em: set. 2011.

CHAPIN, F.S; BLISS, L.C.; BLEDSOE, L.J. Environmental regulation of nitrogen fixation in a high arctic lowland ecosystem. **Canadian Journal of Botanical**, Saskatoon, v. 69, p. 2744–2755, 1991.

CHEN, J.; SAUNDERS, S.C.; CROW, T.R.; NAIMAN, R.J.; 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.

CHEN, G.; HONGLONG, Z.; ZHANG, Y. 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. Research in **Microbiology**, Washington, v 154, p 393-398, 2003

CK AGRICOLA. **Palmito Jussara**. Disponível em: <http://www.ckagricola.com/ckagricola/arquivos/Definição%20palmito%20jussara.doc>, Acesso em: 28 dez. 2009.

CLARKE, K.R.; WARWICK, R.M.; **Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation**. Plymouth Marine. Disponível em: www.primer-e.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.; ELSEROD, A.; WASSON, M.F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, 623-645, 1999.

CLEVELAND C.C; LIPTZIN D. C:N:P stoichiometry in soil: Is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? **Biogeochemistry**, New York, v. 85 p. 235–52, 2007.

COOK, L.J.; RUSSELL, J.S. **The Climate of seven CSIRO Field Stations in Northern Australia - Division of Tropical Crops and Pastures**. Australia : CSIRO, 1983. 38. (Technical Paper,25)

CREWS, TIMOTHY E.; KANEHIRO KITAYAMA; JAMES H. FOWNES; RALPH H. RILEY; DARRELL A. HERBERT; DIETER MUELLER-DOMBOIS; VITOUSEK, P. M.. Changes in Soil Phosphorus Fractions and Ecosystem Dynamics across a Long Chronosequence in Hawaii, **Ecology**, Washington, v 76, p. 1407–1424, 1995

CREWS, T.E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: evolutionary versus ecological considerations. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, p. 233–246, 1999.

CREWS, T.E.; FARRINGTON, H.; VITOUSEK, P.M. Changes in asymbiotic, heterotrophic nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. **Ecosystems**, Wisconsin, v. 3, p. 386–395, 2000.

CHRISTNER, B. **Prokariotic diversity**: The Proteobacteria Part 1. Tureaud Hall: 2012. 17 diapositivos: color.

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.

DA MOTA, A.; OLIVEIRA, R.P.; 2,3.; FILGUEIRAS, T. Poaceae de uma área de floresta montana no sul da Bahia, Brasil: bambusoideae e pharoideae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 60, n.4, p. 747-770, 2009.

DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS H.J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.763-787.

DEDYSH, S.N.; RICKE, P.; LIESACK, W. *NifH* and *NifD* phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. **Microbiology**, Groningen, v. 150, p. 1301–1313, 2004.

DELUCA, T.H.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C.; SELLSTEDT, A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. **Nature**, London, v. 31, n. 419, p. 917-920, 2002

DENISON, W.C. Life in tall trees. **Scientific America**, New York, v. 228, p. 74-80, 1973.

DICKSON, B.A.; CROCKER, R.L. A chronosequence of soils and vegetation near Mt. Shasta. California. 11.The development of the forest floor and the carbon and

nitrogen profiles of the soils. **Europa Journal of Soil Science**, Exeter, v. 4, p. 142-156, 1953.

DIXON, R.A.; CANNON, F.C.; KONDOROSI, A. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, London, V.260, p.268-271, 1976.

DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*, **London**, v.237, p.102-103, 1972

DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; SODERBACK, E.; HILL, S. Regulation of nitrogen fixation by the NifL and NifA proteins from *Azotobacter vinelandii*. In: TIKHONOVICH, I. A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 171-176.

DÖBEREINER, J.V.L.D.; BALDANI, I.; BALDANI, L. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. Brasília:MAARA-EMBRAPA-CNPAB,1995. 60p.

DOJANI, E.; LAKATOS, M.; RASCHER, U.; WANEK, W.; LUTTGE, U.; BUDEL, B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Kusterdingen, v. 202, n. 7, p. 521-529, 2007.

DOMINGUES, T.F. **Photosyntetic gas Exchange in Eastern Amazonian Primary Rain Forest and Pasture Ecosystems**. 2005. 138p. Dissertation (Doctor in Phylosophy) – University of Utah, Salt Lake City, 2005.

DUNBAR, J.; BARNS, S M.L.; TICKNOR, O.; KUSKE, C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3035–3045, 2002.

DUNCAN, R.R.; CARROW, R.N.; HUCK, M. **Turfgrasses and Landscape Irrigation Water Quality – Assessment and Management**. Boca Raton: CRC Press, 2009. 464p.

EBERSPÄCHER, J.; LINGENS, F. TheGenus Phenylobacterium. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotic Vol 1**. New York: Springer, 2006. Chap. 3.1.12. 618-634.

EHLERINGER, J.R.; RUNDEL, P.W. Stable Isotopes: History, Units and instrumentation. In: **Stable Isotopes in Ecological Research**. New York: Springer-Verlag, 1989. p. 1-15.

EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. **Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations**. New York: Academic Press, 1993. 555p.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 28, p. 377-381, 1999.

ELKAN, G.H.; BUNN, C.R. The Rhizobia. In BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. (Ed.). **The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**. New York:Springer-Verlag, 1991. v.3 p. 2197-2213.

ELTINK, M.; TORRES, R.B.; RAMOS, E. *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. **Biblioteca Digital de Ciências**, 11 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/ite/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=670>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

Englund B. Effects of environmental factors on acetylene reduction by intact thallus and excised cephalodia of *Peltigera aphthosa* Willd. **Ecol Bull**, Stockholm, v 26, p. 234–246, 1978.

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.

FINKEL, O.M.; BURCH, A.Y.; LINDOW, S.E.; POST, A.F.; BELKIN, S. Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree, *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 77, p. 21, p. 7647-7655, 2011.

FLORA BRASILIENSIS A OBRA. *Merostachys neesii*. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=6790>. Acesso em: maio, 2012.

FORMAN R. Canopy lichens with blue-green algae: A nitrogen source in a Colombian rain forest. **Ecology**, Davis, v. 56, p. 1176–1184, 1975.

FRAHM, J.P.; O'SHEA, B.; POCS, T.; KOPONEN, T.; PIIPPO, S.; ENROTH, J.; RAO, P.; FANG, Y.M. Manual of Tropical Bryology. **Tropical Bryology**, Germany No. 23. Disponível em: www.bryologie.uni-bonn.de 2003.

FRANZ, S.; OHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. *Methods in Soil Biology*. Berlin: Springer Verlag, 1996.

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.

GALIANA, A.; BALLE, P.; KANGA, A.; DOMENACH, A.M. Nitrogen fixation estimated by the ^{15}N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 34, p. 251–262, 2002.

GALLOWAY, J.N.W.H.; SCHLESINGER, H.; LEVY, A.; MICHAELS, SCHNOOR, J. L. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental Response. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 9, p. 235–252, 1995.

GALLOWAY, J.N.; DENTENER, F.J.; CAPONE, D.G.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R. W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VOROSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: Past, present, and future, **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153–226, 2004.

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.

GEHRING, C.; VLEK, P.L.G.; SOUZA, L.A.G. DENICH, M. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Montpellier, v. 111, p. 237-252, 2005.

GENTILI, F.; NILSSON, M.C.; ZACKRISSON, O. DELUCA, T.H. SELLSTEDT, A. Physiological and molecular diversity of feather moss associative N_2 -fixing cyanobacteria. **Journal Experimental of Botanical**, Colchester, v. 56, p. 3121–3127, 2005.

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

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.

GROFFMAN, P.M.; BUTTERBACH-BAHL, K.; FULWEILER, R.W.; GOLD, A.J.; MORSE, J.L. Challenges to incorporating spatially and temporally explicit phenomena (hotspots and hot moments) into denitrification models. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 93, p. 49–77, 2009.

GUNTHER, A.J. Nitrogen fixation by lichens in a subarctic Alaskan watershed. **The Bryologist**, Boston, v. 92, p. 202–208, 1989.

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

HANDLEY, L.L.; DAFT, M.J.; WILSON, J.; SCRIMGEOUR, C.M.; INGLEBY, K.; SATTAR, M.A. Effects of ecto- and VA-mycorrhizal fungi *Hydnagium carneum* and *Glomus clarum* on the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of *Eucalyptus globulus* and *Ricinus communis*. **Plant Cell & Environment**, Logan, v. 16, p. 375–382, 1993.

HARDY, R. W. F., R.D. HOLSTEN, E. K. JACKSON, AND R. C. BURNS.. The acetylene–ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Wilmington, v 43, p.1185–1207, 1968.

HAWKES, C.V.; WREN, I.F. HERMAN, D.J.; FIRESTONE, M.K. Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. **Ecology Letters**, Davis, v. 8, p. 976–985, 2005.

HEDIN, L.O; BROOKSHIRE, E.N.J.; MENGE, D.N.L.; BARRON, A.R. The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, New York v. 40, p. 613–635, 2009.

HERRERA, R. Nutrient cycling in Amazonian Forest. In: PRANCE, G.T.; LOVEJOY, T.E. (Ed.). **Amazonia**: key environments. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 95–105.

HIETZ, P.; WANEK, W.; WANIA, R.; NADKARNI, N. Nitrogen-15 natural abundance in a montane cloud forest canopy as an indicator of nitrogen cycling and epiphyte nutrition. **Oecologia**, Marburg, v. 131, p. 350–355, 2002.

HONGO, Y.; SHARMA, V.K.; PRAKASH, T.; NODA, S.; TOH, H.; TAYLOR, T.; KUDO, T.; SAKAKI, Y.; TOYODA, A.; HATTORI, M.; OHKUMA, M. Genome of an endosymbiont coupling n_2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. **Science**, Washington, v. 322, p. 1108–1109, 2008.

HOOPER, D.U.; CHAPIN, F.S.; EWEL, J.J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON, J.H.; LODGE, D.M.; LOREAU, M.; NAEEM, S.; SCHMID, B.; SETALA, H.; SYMSTAD, A.J.; VANDERMEER, J. WARDLE, D.A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. **Ecological Monographs**, Petersham v. 75, p. 3–35, 2005.

HUI XIE, C.; YOKOTA, A. Phylogenetic analyses of the nitrogen-fixing genus *Derris*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, Bunkyo-ku, v. 50, p. 129–135, 2004.

HSU, S.F.; BUCKLEY, D.H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 124–136, 2009.

HUSTON, M.A. Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. **Oecologia**, Marburg, v, 110, p. 449–460, 1997.

HSU, S.F.; BUCKLEY, D.H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. **The ISME journal**, New York, v. 3, p. 124–36, 2009.

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.

JOHNSON, D.W.; TODD, D.E. Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 62, p. 1725–1735, 1998.

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

JOLY, C.A., ASSIS, M.A., BERNACCI, L.C., TAMASHIRO, J.Y, CAMPOS, M.C.R., GOMES, J.A.M.A., LACERDA, M.S., SANTOS, F.A.M., PEDRONI, F., PEREIRA, L.S., PADGURSCHI, M.C., PRATA, E.M.B.; RAMOS, E., TORRES, R.B., OCHELLE, A., MARTINS, F.R, ALVES, L.F., VIEIRA, S.A., MARTINELLI, L.A., CAMARGO, P.B., AIDAR, M.P.M., EISENLOHR, P.V., SIMÕES, E., VILLANI, J.P. BELINELLO, R. Floristic and phytosociology in permanent plots of the Atlantic Rainforest along an altitudinal gradient in southeastern Brazil. **Biota Neotrop**, Campinas, v 12 p 1-23. 2012.

JORDAN, C.; CASKEY, W.; ESCALANTE, G.; HERRERA, R.; MONTAGNINI, F.; TODD, R.; UHL, C. Nitrogen dynamics during conversión of primary Amazonian rain forest to slash and burn agriculture. **Oikos**, Ghent, v. 40, p. 131–139, 1983.

JORDANO, P. Geographical ecology and variation of plant-seed disperser interactions: southern Spanish junipers and frugivorous thrushes. In: FLEMING T.H.; ESTRADA, A. (Ed.). **Frugivory and Seed Dispersal: Ecological and Evolutionary Aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. v. 107/108, p. 85-104.

KAHMEN, A.; WANECK, W.; BUCHMANN, N. Foliar $\delta^{15}\text{N}$ values characterize soil N cycling and reflect nitrate or ammonium preference of plants along a temperate grassland gradient. **Oecologia**, Marburg, v. 156, n. 4, p. 861-870, 2008.

KARAMANOS, R.E.; RENNIE, D.A. Changes in natural N-15 Abundance associated with pedogenic processes in soil. Changes on different slope position. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 365-372, 1980.

KERSHAW, K.A. **Physiological ecology of lichens**. London: Cambridge University press, 1985. 293p.

KILLHAM, K. **Soil ecology**. Cambridge: England: University Press, 1994. 242p.

KOEPPEN, W. **Climatologia**. Mexico, D.F: Fondo de Cultura Economica. 1948.

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.

LEARY, J.J.K.; SINGLETON, P.W, BORTHAKUR, D. Canopy nodulation of the endemic tree legume *Acacia koa* in the mesic forests of Hawaii. **Ecology**, Davis, v. 85, p. 3151–3157, 2004.

LEITÃO-FILHO, H.F. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil. **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p. 41-46, 1987.

LEVEAU, J.H.J; LINDOW, S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**. Washington, v. 98, p. 3446-3453, 2001.

LIDSTROM, M.; CHISTOSERDOVA, L. Plants in the Pink: Cytokinin Production by *Methylobacterium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 7, 1818, 2002.

LIDSTROM, M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotic Vol 1**. New York: Springer, 2006. Chap. 1.20. 618-634p.

LIMA, J. **Diversidade de Bacteria e Achaea em solos de mata atlântica no Estado de São Paulo**. 2012. 83p. 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.

LINDSAY, E.A.; COLLOFF, M.J.; GIBB, N.L.; WAKELIN, S.A. The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, p. 5547–5555, 2010.

LINGENS, F.; BLECHER, R.; BLECHER, H.; BLOBEL, F.; EBERSPACHER, J.; FRO HNER, C.; GO RISCH, H.; GO RISCH, H.; LAYH, G. Phenyllobacterium immobile gen. nov., sp. nov., a Gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. **International journal of systematic bacteriorlogy**, Stuttgart, v. 35, p. 26–39. 1985.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 357p.

LUIZÃO, R.C.C.; LUIZÃO, F.J.; PAIVA, R.Q.; MONTEIRO, T.F.; SOUZA, L.S.; KRUIJT, B. Variation of carbon and nitrogen cycling processes along a topographic gradient in a central Amazonian forest. **Global Change Biology**, Oxford, v. 10, p. 592-600, 2004.

MADIGAN, M.; IMHOFF, J. GENUS, X.I. Rhodopila Imhoff, Trüper and Pfennig 1984 341^{VP}. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. 2005.

MAILLY, D.; CHRISTANTY, L; KIMMINS, J.P. 'Without bamboo, the land dies': nutrient cycling and biogeochemistry of a Javanese bamboo *talun-kebun* system. **Forest Ecology and Management**, Victoria, v. 91, p. 155-173, 1997.

MARKEWITZ, D.; DAVIDSON, E.A.; FIGUEIREDO, R.O.; VICTORIA, R.L.; KRUSCHE, A.V. Control of cation concentrations in stream waters by surface soil processes in an Amazonian watershed. **Nature**, London, v. 410, p. 802-805, 2001.

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, p. 45-65, 1999.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.; BROWN, J.; COLWELL, R.; FUHRMAN, J.; GREEN, J.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.; KUSKE, C.; MORIN, P.; NAEEM, S.; OVREAS, L.; REYSENBACH, A.L.; SMITH, V.; STALEY, J. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Natural Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 102–112, 2006.

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

MATSON, P.A.; LOHSE, K.A.; HALL S.J. The globalization of nitrogen deposition: consequences for terrestrial ecosystems. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 113–119, 2002.

McCLAIN, M.E.; BOYER, E.W.; DENT, C.L.; GERGEL, S.E. GRIMM, N.B.; GROVMAN, P.M.; HART, S.C.; HARVEY, J.W.; JOHNSTON, C.A.; MAYORGA, E.; MCDOWELL, W.H.; PINAY, G. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. **Ecosystems**, Wisconsin, v. 6, p. 301–312, 2003.

MENGE, D.N.L; HEDIN, L.O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. **Ecology**, Davis, v. 90, n. 8, p. 2190–2201, 2009.

MENGE, D.N.L.; LEVIN S.A.; HEDIN, L.O. Facultative versus obligate nitrogen fixation strategies and their ecosystem consequences. **The American Naturalist**, New Hampshire, v. 174, p. 465–477, 2009.

MENGE, D.N.L.; DENOYER, J.L.; LICHSTEIN, J.W. Phylogenetic constraints do not explain the rarity of nitrogenfixing trees in late-successional temperate forests. **PLoS ONE**, Oxford, v. 5, n. 8, e12056, 2010.

MERRICK, M.J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G. BURRIS, R.H. EVANS H.J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 835-876.

MicrobeWiki. **Beggiatoa**. Disponível em:
<<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Beggiatoa>>, Acesso: 14 fev. 2012.

MicrobeWiki. **Methylobacterium** Disponível em:
<<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Methylobacterium>>, Acesso: 14 fev. 2012.

MicrobeWiki. **Rhodospirillum**. Disponível em:
<<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodospirillum>>, Acesso: 14 fev. 2012.

MOREIRA, F.M.; DA SILVA, K.; 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, L.P.C.; TALORA, D.C.; TAKAHASI, C.C; BENCKE; ROMERA.E.C.; ZIPPARO, V.B. Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. **Biotropica**, Rio Claro, v 32, p. 811-823, 2000.

MOSEMAN, S.M.; ZHANG, R.; QUAN, P.Y.; LEVIN, L.A. Diversity and functional responses of nitrogen-Wxing microbes to three wetland invasions. **Biological Invasions**, Knoxville, v. 11, p. 225–239, 2009.

MURRELL, J.C.; DALTON, H. Nitrogen Fixation in Obligate Methanotrophs. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 129, p. 3481-3486, 1983.

NARDOTO, G.B. **Abundância natural de 15N na Amazônia e Cerrado – implicações para a ciclagem de nitrogênio**. 2005. 99p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; EHLENGER, 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.

NELSON, D.R; MELE P.M. The impact of crop residue amendments and lime on microbial community structure and nitrogen-fixing bacteria in the wheat rhizosphere. **Soil Research**, Crawley, v. 44, p. 319–329, 2006.

NEUSTUPA J.; ŠKALOUD P. Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 561–570, 2008a.

NEUSTUPA J.; ŠKALOUD P. Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropical mountain habitats. **Biologia**, Bratislava, v. 63, p. 806–812, 2008b.

OLIVEIRA, P. **Jardineiras fiéis. Projeto Ecologia e comportamento de formigas neotropicais**. 2009. 51p. (PESQUISA FAPESP 161)

OTHA, H.; HATTORI, T. *Agromonas oligotrophica* gen. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek**, Louvan-la-neuve, v. 49, p. 429-446, 1983.

OZAWA, T.; OHWAKI, A.; OKUMURA, K. Isolation and Characterization of Diazotrophic Bacteria from the Surface-Sterilized Roots of Some Legumes. *Sci Rep Grad Sch Agric Biol Sci Osaka Prefect Univ, Osaka*, v. 55, p. 29-36, 2003.

PADGURSCHI, M.C.G. **Composição e Estrutura arbórea de um Trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana com Taquaras na Mata Atlântica**. 2010. 133p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

PEREZ, C.A, CARMONA, M.R, ARAVENA, J.C, ARMESTO, J.J. Successional changes in soil nitrogen availability, nonsymbiotic nitrogen fixation and carbon/nitrogen ratios in southern Chilean forest ecosystems. **Oecologia**, Marburg, v. 140, p. 617–25, 2004.

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. **Australian Ecology**, Adelaide, v. 35, p. 148-156, 2010.

PICCOLO, M.C.; NEILL, C.; MELILLO, J.M.; CERRI, C.C.; STEUDLER, P.A. N-15 natural abundance in forest and pasture soils of the Brazilian Amazon Basin. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, n. 2, p. 249-258, 1996.

PINI, P; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Plant-Bacteria Association and Symbiosis: Are There Common Genomic Traits in Alphaproteobacteria? **Genes**, Worcester, v. 2, p. 1017-1032, 2011.

POETA, P.C.F.M. **Anatomia ecológica comparada de folhas de Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) na vegetação de restinga e na**

Floresta Ombrófila Densa. 2004. 96p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, 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.

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

RAIJ, B. van, ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 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.

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.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest, **Ecology**, Davis, v. 89, p. 2924–2934, 2008.

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.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, New York, v. 42, p. 489-512, 2011.
REINHARDT, R.; RAMOS, P.; MANFIO, G.P.; BARBOSA, B.; PAVAN, P.; MOREIRA-FILHO, C. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 414-422, 2008.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; REIS, A. Sustainable yield management of *Euterpe edulis* Martius (Palmae): a tropical palm tree from the Atlantic Tropical Forest – Brazil **Journal of Sustainable Forestry**, New Haven, v. 11, p. 1–17, 2000a.

RODRÍGUEZ, S.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, M.A.; VLAAR, S.; FINNAN, T. Analysis of the legume–rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 95, p. 1367–137, 2003.

ROGOZHINA, Y.; KOSTINA, N.V.; MALYUKOVA, L.S. Estimation of potential nitrogen-fixing activity of agrophytocenoses soils of the subtropical zone of Russia. **Moscow University Soil Science Bulletin**, Moscow, v. 66, n. 1, p. 32–35, 2011.

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. 76p. 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, 108p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010

SEKIYA, J.; SCHMIDT, A.; WILSON, L.G.; FILNER, P. Emission of hydrogen sulfide by leaf tissue in response to L-cysteine. **Plant Physiol**, Lancaster, v. 70, p. 430–436. 1982.

SCHLOSS, P. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 265–275, 2008.

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.

SHILPKAR, P.; SHAH, M.C.; MODI, K.R.; PATEL, S.M. Seasonal changes in microbial community structure and nutrients content in rhizospheric soil of Aegle marmelos tree. **Annals of Forest Research**, Texas, v. 53, n.2, p. 135-140, 2010.

SCHINNER FRANZ; RICHARD OHLINGER; ELLEN KANDELER; ROSA MARGESIN . *Methods in Soil Biology*, Heidelberg, **Springer-Verlag** Berlin, 1996. 426 p.

SIMAS, F.N.B.; SCHAEFER, C.E.G.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; CHAGAS, A.C.; BRANDÃO, P.C. Chemistry, mineralogy and micropedology of highland soils on crystalline rocks of the Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 187-201, 2005.

SILVA, G.; Da SILVA, J., De MELO, V. Efeitos de diferentes usos da terra sobre as características químicas de um latossolo amarelo do Estado do Pará. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 2, p. 151 – 158, 2006.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SINDA-SISTEMA NACIONAL DE DADOS AMBIENTAIS-INPE. Estações Picinguaba, Santa Virginia. Disponível em: < <http://serradomar.cptec.inpe.br/> >. Acesso em: junho, 2012.

SOS MATA ATLÂNTICA. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005**. 2008. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>> Acesso em: 10 mar. 2010.

SOUZA NETO, E.R. de **Perdas de nitrogênio pela emissão de óxido nitroso (N₂O) e sua relação com a decomposição da serapilheira e biomassa de raízes na floresta de Mata Atlântica**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SODERLAND, R.; ROSSWALL, T. The nitrogen cycle. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **The Natural Environment and Biogeochemical Cycles**. New York: Springer, 1982. p. 61–81.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C.; ZENA T.A.; IGWE, C.A.. Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soils in Ethiopia. **Soil Use Manage**, Stirling, v. 18, p. 404-411, 2002.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen-fixing organisms**. pure and applied aspects. New York: Chapman Hall, 1990. 256p.

SPRENT J.I. Nodulated legume trees. In: Werner D, Newton WE (eds) Nitrogen fixation in agriculture, forestry and the environment. **Springer**, Netherlands, p. 113–141, 2005.

STEDMAN, D.H.; SHETTER, R.E. The Global Budget of Atmospheric Nitrogen Species. In: SCHWARTZ, S.E. (Ed.). **Trace atmospheric constituents: properties, transformations, and fates**. New York: Wiley, 1983, p. 411- 454.

STEVENSON, G.. Fixation of nitrogen by non-nodulated seed plants. **Annals of Botany**, Oxford, v 23, p. 622-635. 1959

STEVENSON, F.J. Chemical state of the nitrogen in rocks. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Urbana, v. 26, p. 797-809, 1962.

STEWART, K.J.; COXSON, D.; SICILIANO, S.D. Small-scale spatial patterns in N₂-fixation and nutrient availability in an arctic hummock-hollow ecosystem. **Soil, Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 43, p. 133–140, 2011.

STREICHER, S.L.; GURNEY, E.G.; VALENTINE, R.C. The nitrogen fixation genes. *Nature*, London, v. 239, p.495-499, 1972.

SWAMINATHAN, M. S. Ever-Green Revolution and Sustainable Food Security. **M.S. Swaminathan Research Foundation**, Chennai, 13p, disponível em: <http://nabc.cals.cornell.edu/pubs/nabc_16/talks/Swaminathan>, acesso em: 15 de jan. 2012.

TANNER E.V.J.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS E. Experimental investigation of nutrient limitation of forest growth on wet tropical mountains. **Ecology**, Brooklyn, v. 79, p. 10-22, 1998.

THIJS J. G. E.; SIV G. E. A. The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Biology letters**, Uppsala, v. 5, p. 429-432, 2009.

TEIXEIRA, K.R. dos S. Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32). , Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc032.pdf>> Acesso em: Jan 2012.

TENG Q.H; SUN B.; FU XR; LI SP; CUI Z.L.; CAO H. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China. *J. Microbiol. Nanjing*, v.47 p. 165–41. 2009.

TIESSEN H.; CHACON P.; CUEVAS E. Phosphorus and nitrogen status in soils and vegetation along a toposequence of dystrophic rainforests on the upper Rio Negro, **Oecologia**, Marburg, , v 99, p. 145–150, 1994b

TOUKDARIANT, A.E.; LIDSTROM, M.E. Nitrogen Metabolism in a New Obligate Methanotroph, '*Methylosinus*' Strain 6. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.130, p.1827-1837, 1984.

TRIPLETT, E.W.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W.; HANDELSMAN, J. What's new in nitrogen fixation. **ASM News**, Washington, v. 55, p. 15-21, 1989.

TSUKAMOTO-FILHO, A.A.; MACEDO, R.L.G.; VENTURIN, N.; MORAIS, A.R. Aspectos fisiológicos e silviculturais do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) plantado em diferentes tipos de consórcios no município de lavras, Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v.7, p.41-53, 2001.

VITOUSEK, P.M.; SANFORD, R.L. Nutrient cycling in moist tropical forest. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, Stony Brook, v. 17, p. 137–167, 1986.

VITOUSEK, P.M.; ABER, J.D.; HOWARTH, R.W. LIKENS, G.E.; MATSON, P.A.; SCHINDLER, D.W.; SCHLESINGER, W.H.; TILMAN, D.G. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Application**, Boulder, v. 7, p. 737–750, 1997.

VITOUSEK, V.; HOBBIE, S. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. **Ecology**, Davis, v. 81, p. 2366-2376, 2000.

VITOUSEK PM, CASSMAN K, CLEVELAND C, CREWS T, FIELD CB, 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.

VITOUSEK, P.M.; PORDER, S.; HOULTON, B.Z.; CHADWICK, O.A. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications and nitrogen-phosphorus interactions. **Ecological Application**, Boulder, v. 20, n.1, p. 5–15, 2010.

WALDROP, M.P.; FIRESTONE, M.K. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 52, p. 470–479, 2006.

WARNEKE, C.; KARL, T.; JUDMAIER, H.; HANSEL, A.; JORDAN, A.; LINDINGER, W.; CRUTZEN, P.J. Acetone, methanol, and other partially oxidized volatile organic emissions from dead plant matter by abiological processes: significance for atmospheric chemistry. **Journal Geophysical Research**, v. 13, p. 9–18, 1999.

WEON, H. Y.; YONG KIM, B.; WO KWON, S.; JOO GO. S.; SUNG KOO, B.; STACKEBRANDT, E. *Phenylobacterium composti* sp. nov., isolated from cotton waste compost in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Basingstoke, v. 58, p. 2301–2304, 2008.

WOODMANSEE, R.G.; VALLIS, I.; MOTT, J.J. Grassland nitrogen. In: CLARK, F.R.; ROSSWALL, T. (Ed). **Terrestrial nitrogen cycles**. Stockholm: Ecol. Bull, 1981. p. 33:443–462.

WICKSTROM, C.; GARONO, R. Associative Rhizosphere Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) Among Plants from Ohio Peatlands. **Ohio Journal of Science**, Columbus, v. 107, n. 3, p. 39-43, 2007.

WILSON, M.; LINDOW S. E. Coexistence among Epiphytic Bacterial Populations Mediated through Nutritional Resource Partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**, Berkeley, v 60, p. 4468-4477, 1994.

YAMANAKA, T.; HIRAI, K.; AIZAWA, S.; YOSHINAGA, S.; TAKAHASHI, M. Nitrogen- fixing activity in decomposing litter of three tree species at a watershed in eastern Japan. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 16, p. 1–7, 2011.

YEAGER, C.M.; KORNOSKY, J.L. HOUSMAN, D.C.; GROTE, E.E.; BELNAP, J.; KUSKE, C. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the colorado plateau and Chihuahuan desert. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 973–983, 2004.

YONEYAMA, T. Characterization of natural ^{15}N abundance of soils. In: Boutton, T.W.; Yamsahi, S., (Ed.) **Mass Spectrometry of Soils**. Marcel Dekker: New York, p. 225-246, 1996.

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.

ZIELKE, M.; EKKER, A. S.; OLSEN, R. A.; SPJELKAVIK, S.; SOLHEIM, B. The Influence of Abiotic Factors on Biological Nitrogen Fixation in Different Types of Vegetation in the High Arctic, Svalbard, **JSTOR**, Boulder, v. 34, p. 293-299, 2002.

ANEXOS

nexo A – $\delta^{15}\text{N}$ nas duas épocas de coleta, em solo e filosfera das espécies: *E. edulis*, *G. opposita*, *M. neesii* e dermosfera de *E. edulis* e *G. opposita*

	SOLO		DERMOSFERA		FILOSFERA	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
PESM Picinguaba						
<i>E. edulis</i>	6,12±0,15a	5,14±0,16b	0,30±0,31a	1,25±0,26a	2,29±0,18b	1,60±0,50bc
<i>G. opposita</i>	6,20±0,23a	5,24±0,24b	-0,45±0,53b	0,17±0,51a	3,15±0,36a	3,74±0,26a
PESM Santa Virginia						
<i>E. edulis</i>	4,58±0,34b	4,94±0,30b	1,05±0,60a	0,29±0,46a	4,00±0,33a	1,20±0,41c
<i>G. opposita</i>	5,48±0,27ab	4,99±0,29b	0,35±0,51a	0,56±0,66a	2,55±0,34b	3,78±0,39a
<i>M. neesii</i>	5,10±0,14b	4,60±0,28b	-----	-----	2,96±0,33ab	1,76±0,31bc

Os valores representam a média (n=10) ± desvio padrão. Letras iguais dentro do mesmo compartimento (filosfera, dermosfera, solo) não diferem significativamente entre si (t - test; p≤0,05)

Anexo B - Estimativa de taxas de FBN, durante dois anos, no solo e serapilheira das duas áreas de amostragem

Estação	PARCELAS	
	PESM - Picinguaba	PESM – Santa Virginia
Kg N ha⁻¹ ano⁻¹		
Solo		
Inverno - 2009	0,53±0,06e	0,63±0,04e
Verão - 2010	2,68±0,31b	8,44±1,06a
Verão - 2011	1,75±0,19c	0,95±0,13d
Inverno - 2011	1,68±0,15c	3,79±0,91b
Serapilheira		
Inverno - 2009	14,43±2,78b	29,10±4,01a
Verão - 2010	16,06±2,48b	3,25±0,37e
Verão - 2011	6,02±0,58c	4,62±0,46d
Inverno - 2011	8,80±1,08b	5,12±29,108c

Os valores representam a média (n=100) ± desvio padrão. Letras iguais nas duas locações e dentro do mesmo substrato (solo, serapilheira) não diferem significativamente entre si (t - test.; p≤0,05). Os dados correspondem à relação 3:1 (por cada 3 mol de Acetileno reduzido para etileno, tem uma mol de N fixado (HARDY,1968)

Anexo C - Atividade da nitrogenase da serapilheira e extrapolação para FBN

	Inverno		Verão	
	2009	2011	2010	2011
PESM-Picinguaba				
Nmol etileno g ⁻¹ h ⁻¹	55,60	59,37	75,46	88,61
Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹	14,43	8,80	16,06	6,02
PESM-Santa Virginia				
Nmol etileno g ⁻¹ h ⁻¹	98,0	12,43	21,70	60,37
Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹	29,10	5,12	3,25	4,62

Os dados correspondem à relação 3:1 (por cada 3 mol de Acetileno reduzido para etileno, tem uma mol de N fixado (HARDY,1968)

Anexo D - Atividade da nitrogenase e extrapolação para FBN no solo do grid

	Inverno		Verão	
	2009	2011	2010	2011
PESM-Picinguaba				
Nmol etileno g ⁻¹ h ⁻¹	1,78	5,65	9,62	5,89
Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹	0,53	1,68	2,68	1,75
PESM-Santa Virginia				
Nmol etileno g ⁻¹ h ⁻¹	2,12	12,76	28,42	3,19
Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹	0,63	3,79	8,44	0,95

Os dados correspondem à relação 3:1 (por cada 3 mol de Acetileno reduzido para etileno, tem uma mol de N fixado (HARDY,1968)