

| | | | |
|----------------------|----------|---------|------|
| Acta Limnol. Brasil. | Vol. III | 517-543 | 1990 |
|----------------------|----------|---------|------|

FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO (REDUÇÃO DO ACETILENO) EM FILOSPERA DE *Nymphoides indica* (L.) O. KUNTZE

ESTEVES, M.R.*; PONTES, M.C.F.**; BALLESTER, M.V.R.* e SANTOS, J.E.*

RESUMO

Foi investigada a fixação do nitrogênio (redução do acetileno - C_2H_2) associada a folhas de *N. indica*, coletadas de área da Represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP), densamente povoada por macrófitas aquáticas. A atividade significativa da redução do C_2H_2 foi correlacionada com a presença de cianobactérias heterocistadas (*Tolyphothrix* sp) em folhas não lavadas. A redução do C_2H_2 não foi estimulada pela adição de glicose, em condições aeróbias e sob intensidade luminosa de 3.000 lux, sugerindo que, predominantemente, as taxas de produção de C_2H_4 se devem a organismos autotróficos. As taxas de N_2 fixado por dia (0,7 - 1,75 $\mu g N_2/g$ PS), suportam considerações que a fixação biológica do nitrogênio via filosfera, fornece cerca de 5-10% do elemento necessário à produção foliar de *N. indica*, para a estação de coleta na área estudada da Represa do Lobo.

* UFSCar - São Carlos, SP

** UFV - Viçosa, MG

ABSTRACT - NITROGEN FIXATION (ACETYLENE REDUCTION) IN THE PHYLLOSPHERE OF *Nymphoides indica* (L.)

Nitrogen fixation (acetylene $-C_2H_2-$ reduction) associated with leaves of the aquatic macrophyte *Nymphoides indica* (L.) was investigated at one site in Lobo Reservoir (São Carlos, State of São Paulo). Significant C_2H_2 reduction activity was correlated with the presence of a heterocystous blue-green alga (*Tolyphothrix* sp) on unwashed leaves. C_2H_2 reduction was not stimulated by addition of glucose in aerobic conditions at a light intensity of 3000 lux, suggesting a predominantly autotrophic origin of C_2H_4 production. Daily N_2 fixation rates (0.7 - 1.75 $\mu g N_2/g$ dry weight) support the theory that biological fixation of nitrogen via the phyllosphere furnishes about 5-10% of the element necessary to foliar production in *N. indica*, at this site and station in Lobo Reservoir.

INTRODUÇÃO

A filosfera, habitat constituído pela camada entre a folha e a atmosfera, está sujeita à ação reguladora e combinada dos dois ambientes (RUINEN, 1975). É considerada, intrinsecamente, um ambiente aquático abrigando microrganismos com necessidades e tolerâncias nutricionais amplamente divergentes e, conseqüentemente, com potencialidades extremamente diversas para o seu estabelecimento e sobrevivência, estando restritos a uma teia alimentar que inicia e termina na folha. Como em qualquer ecossistema, estas circunstâncias são ajustadas pela soma total dos organismos, pelo ambiente e pelos processos de interação entre e dentro de todos os seus componentes (GATES, 1968). Estas considerações foram utilizadas para discutir os sistemas de controle da filosfera como uma unidade ecológica (QUISPEL, 1974), onde

a superfície foliar foi apresentada como unidade acumuladora, transportadora e distribuidora de energia, gases atmosféricos, compostos nitrogenados e água entre os compartimentos solo e atmosfera (PATE, 1973).

De acordo com nomenclatura recentemente proposta (International Workshop on Associative N₂ Fixation, Piracicaba, 1979) a associação entre folhas de plantas e microrganismos fixadores do nitrogênio foi denominada filocenose. O que ainda não está bem esclarecido, é até que extensão a ocorrência de fixadores de nitrogênio na filosfera pode ser considerada uma associação ou uma filocenose (DOBEREINER, 1983).

Fixadores do nitrogênio de vida livre encontram um habitat preferencial na filosfera (RUINEN, 1956), devido aos nutrientes e substratos energéticos fornecidos pela planta, além de outros requerimentos necessários à sobrevivência dos mesmos. Estes requerimentos que diferem daqueles necessários aos demais componentes da comunidade microbiológica foliar, podem conduzir a uma boa adaptação nos microhabitats (RUINEN, 1970), além de ampliar os limites de colonização da superfície foliar através de uma sucessão de fixadores do nitrogênio com diferentes potenciais (WATANABE et alii, 1982). Deste modo, os fixadores crescem e fixam o nitrogênio sob condições inibitórias para o desenvolvimento de outros colonizadores do ecossistema e, possivelmente, se beneficiam da tensão reduzida do oxigênio (GALLON, 1981), causada por populações mais numerosas (MULDER et alii, 1969; DARBYSHIRE, 1972; RUINEN, 1975). Além dessas considerações, tem sido evidenciada a participação de algum fator essencial de crescimento, resultante das possibilidades de desenvolvimento associativo entre bactérias, fungos, leveduras e microrganismos fixadores do nitrogênio em microhabitats de superfície foliar (BUNT, 1961; JENSEN & HOLM, 1975). Nesta situação, o uso eficiente do "input" de metabolitos altamente energéticos da planta para o sistema

filosfera (RUINEN, 1965), pode ser consideravelmente prejudicado pela coordenação de tais microrganismos na cadeia alimentar com relação aos substratos preferenciais (RUINEN, 1975).

A fixação do nitrogênio em filosfera tem sido demonstrada em laboratório e "in situ" através dos métodos de Kjeldahl, redução do acetileno ($C_2H_2-C_2H_4$) e N^{15} . Contudo, os aspectos quantitativos até agora obtidos são bastante divergentes. Este fato é compreensível, desde que o processo resulta da interação de muitas variáveis (CAPONE & TAYLOR, 1977). É também igualmente certo que até o momento o mesmo não tenha sido satisfatoriamente analisado (RUINEN, 1975), e muito menos os resultados obtidos, nos diferentes campos de pesquisa, compreendidos dentro de um significado ecológico.

Os objetivos deste trabalho foram: (1) obter informações preliminares sobre a extensão da fixação do nitrogênio através da comunidade perifítica da filosfera de *N. indica*, na presença de uma fonte de carbono adicional, aerobiose e iluminação, e (2) quantificar a contribuição do processo com relação à produtividade foliar em termos dos requerimentos do elemento.

MATERIAL E MÉTODOS

A Represa do Lobo, Brotas-Itirapina, SP, considerada como um sistema mesoligotrófico (TUNDISI, 1977), apresenta uma região mais eutrofizada, alta represa, caracterizada por um intenso desenvolvimento de macrófitas aquáticas (SANTOS et alii, 1986). Em relação às áreas de distribuição das mesmas, *N. indica* é a que apresenta maior valor, ao redor de 0,27 Km² (BARBIERI, 1984) e uma porcentagem relativa à área da represa (6,8 Km²) ao redor de 4,1% (GAZARINI, 1983).

Folhas de *N. indica*, com as plantas intactas,

foram coletadas, mensalmente, na região da alta represa, no período entre abril a outubro de 1985, transportadas para o laboratório em sacos plásticos com água do local e utilizadas experimentalmente no mesmo dia. Simultaneamente, foram realizadas análises das concentrações de nitrato (MACKERET et alii, 1978), nitrito (STRICKLAND & PARSONS, 1960) e amônia (GRASSHOFF, 1976) de amostras da água do estande de *N. indica*.

Para estimativa da biomassa foram coletadas (3 réplicas), aleatoriamente, durante o período de estudo, utilizando-se um amostrador de 0,25 m² de área (WESTLAKE, 1974). A localização e a profundidade dos estandes homogêneos foram, relativamente, sempre as mesmas, evitando-se locais prejudicados por coletas anteriores. Partes subterrânea e área foram separadas e lavadas para a remoção do sedimento e perifíton, respectivamente. A seguir, o material foi colocado na estufa a 70°C, até obtenção de peso seco constante. Os resultados foram expressos em g de peso seco/m². O nitrogênio total da filosfera foi determinado através do método de Kjeldahl com algumas modificações (BARBIERI, 1984). Os resultados foram expressos em g N₂/gPS/m².

A fixação do nitrogênio foi estimada pelo método de redução do C₂H₂ (STEWART et alii, 1967; HARDY et alii, 1968). Pedacos de folhas com cerca de 2 cm foram colocados em frascos de vidro (10 ml de volume) contendo 2,0 ml de meio BG-11 (ALLEN & STAINER, 1968), isento de nitrogênio. Os frascos foram vedados com rolha de borracha e neles adicionados C₂H₂ (HARDY et alii, 1968; FINKE & SEELEY, 1978). A seguir, foram submetidos a 4 tratamentos experimentais básicos: folhas com material perifítico com e sem glicose e folhas lavadas com e sem glicose. O processo de lavagem foi realizado até a retirada total do perifíton aderente à filosfera. Os frascos de reação foram incubados à temperatura de 26-30°C, sob 3000 lux de intensidade luminosa. Em intervalos variados, 0,5 ml da fase gasosa dos

frascos de reação foi removida e ensaiada por cromatografia gasosa (SANTOS et alii, 1986). Baseado na proporção teórica (4:1) dos requerimentos de elétrons para a redução do C_2H_2 e N_2 , respectivamente, pela nitrogenase (HARDY et alii, 1968; RUINEN, 1975; FINKE & SEELEY, 1978), foi estimada a produção do C_2H_4 relacionado com o peso seco de folhas com material perifítico, e o resultado transformado, posteriormente, em valores de N_2 fixado.

Em folhas onde foi visível a presença de cianobactérias, estas foram removidas do material foliar para frascos de reação contendo meio BG-11 e ensaiadas por cromatografia gasosa para verificação da atividade da nitrogenase. A caracterização de bactérias heterótrofas fixadoras do nitrogênio foi realizada, através da inoculação de pedaços do material foliar em frascos contendo meio semi-sólido, isento de nitrogênio, com ácido málico e glicose como fontes de carbono (PATRIQUIN, 1978). Os frascos foram incubados a $30^{\circ}C$ e após 48 horas submetidos a técnica de redução do C_2H_2 (SANTOS et alii, 1983).

RESULTADOS

Os valores de nutrientes observados em amostras de água do estande de *N. indica* estão registrados na Tab. 1; os valores mensais de biomassa e nitrogênio total das folhas na Tab. 2.

As curvas representativas do tempo de redução do C_2H_2 para filosfera de *N. indica* estão representadas na Fig. 1. Folhas lavadas apresentaram taxas de redução do C_2H_2 inferiores a de folhas não lavadas, como resultado da remoção parcial do perifíton aderente. Todas as amostras de folhas não lavadas, submetidas a incubação para verificação da atividade da nitrogenase, revelaram a presença de colônias de *Tolyphothrix* sp, a epífita visivelmente

Tabela 1 - Nutrientes da água do estande N.
Índica.

| Período | Nutrientes Dissolvidos ($\mu\text{g.l}^{-1}$) | | |
|---------|---|-----------------|-----------------|
| | NO_3^- | NO_2^- | NH_4^+ |
| Abr. | 2,2 | 0,5 | 21,0 |
| Mai. | 0,6 | 0,8 | 18,0 |
| Jun. | 0,2 | 0,1 | * |
| Jul. | * | * | 20,0 |
| Ago. | 0,4 | * | * |
| Set. | 0,4 | 1,1 | 7,4 |
| Out. | 0,2 | * | 6,6 |

(*) teor não detectado pelo método.

Tabela 2 - Valores de biomassa e concentração do nitrogênio total em folhas de *M. indica*.

| Período | Biomassa Foliar (g peso seco/n ²) | Nitrogênio Total Foliar (% peso seco) |
|---------|--|--|
| Abr. | 33,4 | 2,33 |
| Mai. | 23,3 | 2,78 |
| Jun. | 28,2 | 3,10 |
| Jul. | 18,7 | 2,04 |
| Ago. | 28,4 | 3,19 |
| Set. | 12,0 | 4,33 |
| Out. | 12,4 | 4,14 |

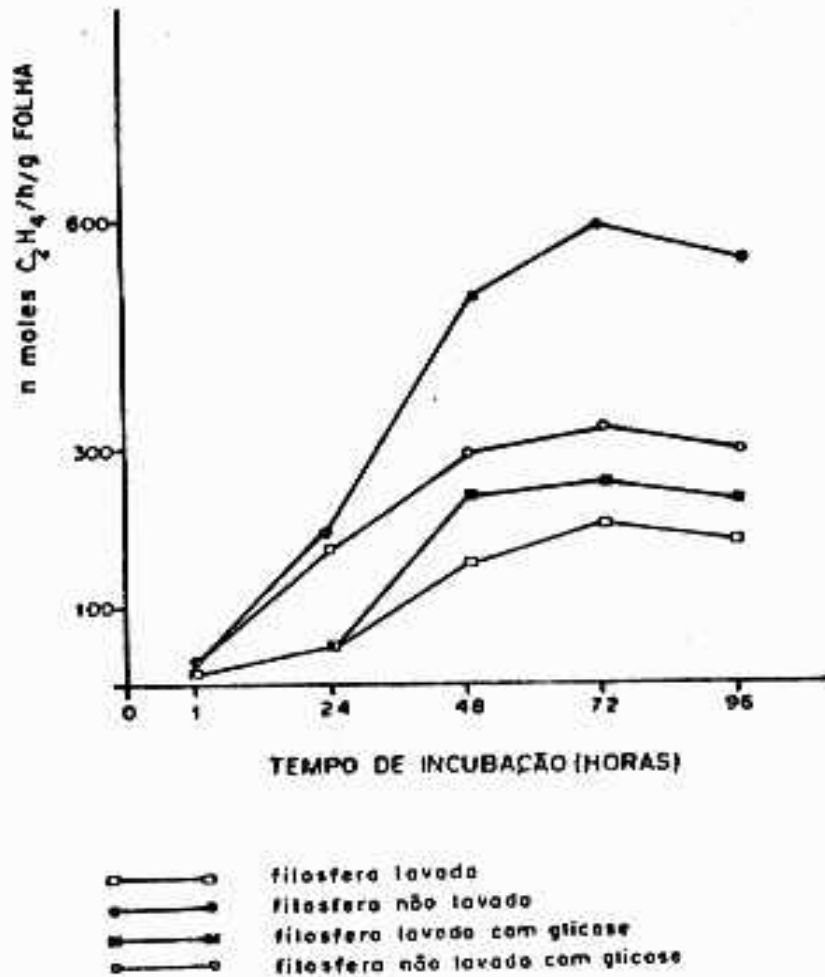


Figura 1 - Tempo de duração da redução do acetileno associado a filofera de *Nymphoides indica* na presença de luz.

predominante. A adição de glicose nos tratamentos realizados não permitiu evidenciar uma otimização das taxas de redução do C₂H₂ por ação de microrganismos heterótrofos. Isso permitiu considerar que as taxas de produção do C₂H₄ nas amostras de *N. indica* analisadas são de origem, predominantemente, autótrofa. C₂H₄ não foi produzido pela filofera na ausência de C₂H₂ e também a atividade de redução do C₂H₂ não foi associada com amostras de água do estande da macrófita aquática.

Foi evidenciada uma relação linear entre as taxas de produção do C_2H_4 e o peso seco de folhas de *N. indica* com material perifítico. C_2H_4 foi produzido a uma taxa linear sem um período apreciável de fase lag (Fig. 2).

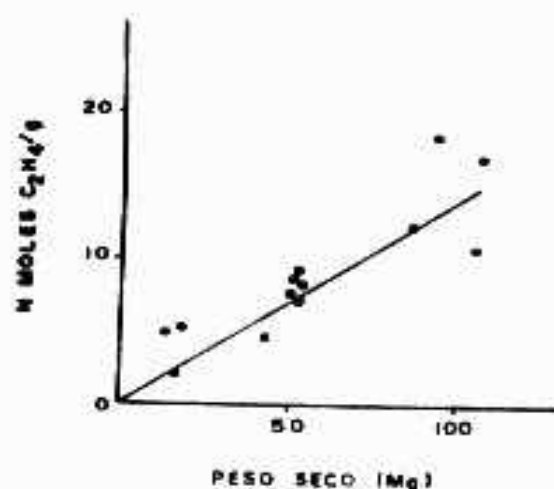


Figura 2 - Correlação da atividade de redução do C_2H_2 com peso seco de folhas com material perifítico de *N. indica*. Incubação a $30^{\circ}C$ por 2 horas e 3.000 lux de intensidade luminosa ($r^2 = 0,95$).

Colônias de *Tolyphothrix* sp removidas diretamente do material foliar não lavado, ensaiadas por cromatografia gasosa, demonstraram baixa atividade de redução de C_2H_2 (50-100 n moles C_2H_4 /h/g peso fresco), provavelmente, devido aos danos provocados, quando na remoção das mesmas. Contudo, quando cultivadas em meio BG-11, isento de nitrogênio, apresentaram taxas significativas (Fig. 3) de redução do C_2H_2 (200-600 n moles C_2H_4 /h/g peso fresco). Em função das taxas de N_2 fixado de folhas de *N. indica* com material perifítico, valores mensais de biomassa e do conteúdo de nitrogênio das mesmas, foi estimado que a fixação biológica, via filosfera, contribui com cerca de 5-10% do elemento necessário à produtividade foliar da macrófita aquática (Tab. 3).

Tentativas para o isolamento de microrganismos

Tabela 3 - Contribuição relativa do nitrogênio através da fixação biológica do nitrogênio via filosafera de *N. indica* durante o período de estudo.

| Período | Biomassa Filosafera (g peso seco/m ²) | Conteúdo N (gN ₂ /g peso seco filosafera) | Taxa N ₂ Fixado (µgN ₂ /dia/g) | Contribuição de N para Biomassa (%) |
|---------|--|--|---|---|
| Abr. | 33,4 | 0,19 | 1,05 | 5,0 |
| Mai. | 23,3 | 0,16 | 0,70 | 4,0 |
| Jun. | 28,2 | 0,21 | 1,47 | 7,0 |
| Jul. | 18,7 | 0,09 | 0,84 | 9,0 |
| Ago. | 28,4 | 0,22 | 1,75 | 8,0 |
| Set. | 12,0 | 0,13 | 1,40 | 10,0 |
| Out. | 12,4 | 0,13 | 1,26 | 9,5 |

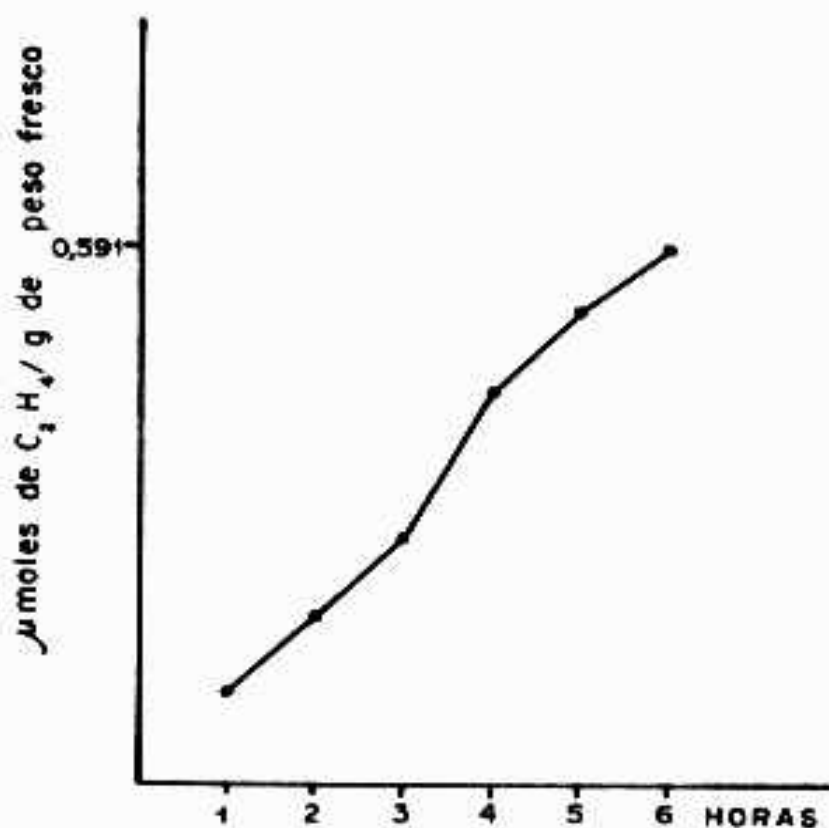


Figura 3 - Tempo de duração da redução do acetileno em *Tolyphothrix* sp em meio BG-11 a 10% do C₂H₂.

heterótrofos fixadores do nitrogênio em meio semi-sólido, isento do elemento, com ácido málico e glicose como fontes de carbono, resultaram em crescimento diverso, desde moderado até ausente, com evidências de bactérias dos gêneros *Azotobacter* sp e *Azotobacter indicum*. O isolamento foi dificultado pela presença de uma comunidade microbiológica bastante diferenciada de fungos, protozoários e leveduras. Baseado nas taxas de redução do C₂H₂ evidenciadas, bactérias fixadoras de nitrogênio não constituem, provavelmente, uma fração significativa da população heterótrofa total perifítica.

DISCUSSÃO

Embora a importância de macrófitas aquáticas colonizando a região litorânea de ambientes aquáticos (WETZEL, 1964; SOUZA, 1977; BARBIERI, 1984; MENEZES, 1984) e produtividade primária de epífitas associadas estejam bem documentadas (ALLEN, 1971; PANITZ, 1980; SOARES, 1981), quase inexistem trabalhos relacionados a atividade fixadora de nitrogênio por epífitas (RUINEN, 1975; SILVER & JUMP, 1975; CAPONE & TAYLOR, 1977; FINKE & SEELEY, 1978). Contudo, não é surpresa que a redução do C_2H_2 esteja relacionada, universalmente, com amostras de plantas coletadas de ambientes aquáticos, frequentemente associadas com cianobactérias e bactérias fixadoras do N_2 (GRANHALL & LUNDGREN, 1971; RUINEN, 1975; CAPONE et alii, 1979).

A técnica de redução do $C_2H_2 - C_2H_4$ tem sido amplamente utilizada para a estimativa da fixação do N_2 em uma grande variedade de organismos e associações (HARDY et alii, 1973). A proporção de C_2H_4 produzido para N_2 fixado, na grande maioria dos trabalhos, é equivalente a 3:1, respectivamente. Contudo, dependendo do sistema estudado os valores têm sido bastante diferentes (STEIN & DELWICHE, 1970; BROUZES et alii, 1971; WITTY, 1979), como resultado das diferenças de solubilidade do N_2 e C_2H_2 (RICE & PAUL, 1971). De modo geral, estudos relacionados a fixação do N_2 em filosfera de macrófitas aquáticas têm se utilizado de proporção 4:1 (GOERING & PARKER, 1972; McROY & CHANEY, 1973; CAPONE & TAYLOR, 1977; FINKE & SEELEY, 1978). Longos períodos de duração de exposição ao C_2H_2 têm sido considerados como responsáveis por uma superestimativa da fixação do N_2 (WITTY, 1979). Embora tal prática não seja desejável, não há outro modo de se realizar um estudo relacionado ao tempo de duração da fixação do (redução do C_2H_2) N_2 nos diferentes sistemas (GOERING & PARKER, 1972; McROY & CHANEY, 1973; HEAD & CARPENTER, 1975; SILVER & JUMP, 1975; CAPONE & TAYLOR, 1977; FINKE & SEELEY, 1978), sem a exposição ao C_2H_2 por longos períodos. De qualquer modo, muito pouco é conhecido a respeito da ação de tais

efeitos (DAVID & FAY, 1977).

As taxas de redução do C_2H_2 observadas em filosferas, lavada e não lavada, de *N. indica*, sem glicose, sugerem que associadas às mesmas, ocorre uma população ativa de cianobactérias fixadoras de N_2 . Colônias de *Tolyphothrix* sp foram evidentes em folhas, sempre que a redução do C_2H_2 foi rapidamente observada neste estudo. Estas observações estão de acordo com considerações efetuadas em investigações similares, relatando a presença de cianobactérias em filosfera de macrófitas aquáticas (GOERING & PARKER, 1972; McROY & CHANEY, 1973; CAPONE & TAYLOR, 1977). Parece haver uma correlação entre a fixação do N_2 em filosfera de *N. indica* e a de *Tolyphothrix* sp. Isto não é surpreendente, desde que estas cianobactérias (STEWART, 1971), além de outras como *Anabaena* sp, *Nostoc* sp e *Gloetrachia* sp (FINKE & SEELEY, 1978; CAPONE et alii, 1979), têm sido relatadas como importantes no fornecimento do nitrogênio em ambiente aquático.

Foi confirmado, recentemente, que a fixação do N_2 por bactérias epifíticas pode ser suportada por substratos carbonáceos fornecidos pela planta hospedeira. Além disto, a adição de glicose pode otimizar a redução do C_2H_2 (HEAD & CARPENTER, 1975). Isto não ocorreu neste estudo. Provavelmente, a filosfera de *N. indica* favorece o desenvolvimento de *Tolyphothrix* sp, que parece ser o único microrganismo, além de *Anabaena* sp, a fixarem N_2 em condições aeróbias. As bactérias heterótrofas observadas, *Azotobacter* sp e *Azotomonas* sp, consideradas aeróbias estritas, fixam melhor o N_2 à baixas tensões de oxigênio (DROZD & POSTGATE, 1970). Isto não foi evidenciado neste estudo. Contudo, apesar das superfícies foliares de macrófitas aquáticas serem consideradas como prováveis locais da existência de microambientes anaeróbios ou microaerófilos (PATRIQUIN & KNOWLES, 1975), a contribuição da fixação do N_2 via bactérias epifíticas de filosfera de *N. indica*, não foi significativa, mesmo na presença de

carboidrato adicional. A maior atividade da nitrogenase algal observada, pode, efetivamente, estar relacionadas ao estabelecimento de microzonas consumidoras de oxigênio ao redor das células heterocistadas de *Tolyphothrix* sp, devido a utilização dos produtos da excreção algal no crescimento das bactérias perifíticas; semelhante ao descrito para *Anabaena* sp (PAERL, 1978).

Como ambiente, a filosfera tem sido, favoravelmente, comparada ao solo, onde o significado de bactérias de vida livre no balanço de nitrogênio do ecossistema tem sido refutado com base nos seguintes argumentos (RUINEN, 1975): (1) a eficiência da fixação do N_2 em condições laboratoriais é baixa, variando de 2-20 mgN/g carboidrato consumido em condições aeróbias, aumentando para ordem de 40 em condições simbiotróficas ou sob tensões reduzidas de pO_2 ; (2) a ocorrência de *Azotobacter* sp no solo está relacionada a aplicação de material energético; (3) altos níveis de carboidratos e outros compostos carbonáceos não são prontamente disponíveis no solo; (4) a fixação do N_2 tem início numa proporção C:N superior a 10, igualmente rara no solo; (5) a necessidade de uma baixa tensão do O_2 para uma fixação eficiente, não é consistente com bons solos aráveis.

A excreção de compostos orgânicos como substratos para microrganismos não é restrito às raízes de vegetais superiores. As folhas também excretam tais compostos e sob determinadas condições grandes quantidades de carboidratos e aminoácidos têm sido evidenciados como exudados (MULDER et alii, 1969). Contudo, o desenvolvimento de uma microflora na filosfera de vegetais superiores não depende apenas dos exudados, tipos e quantidades e teor de nutriente da planta, mas também das condições climáticas. Temperaturas como as de regiões tropicais são, altamente, favoráveis ao desenvolvimento de bactérias do tipo *Azotobacter* (RUINEN, 1956), com estimativas ao redor de 10^7 azotobacters e 2.10^7 beijerinckias (*Azotobacter indicum*)

por cm^2 do material foliar (RUINEN, 1961). Evidências numéricas de tal ordem têm levado a consideração, de que estes organismos podem contribuir com os requerimentos do nitrogênio das plantas. Contudo, estes dados quantitativos devem ser considerados em relação às espécies de plantas e as condições ambientais do habitat (RUINEN, 1975).

Pouco se conhece do efeito do crescimento associado de bactérias fixadoras do nitrogênio com a comunidade contaminante na eficiência do processo de fixação do N_2 (SANTOS & LACAVA, 1984). A presença de *Rhodotorula* sp na filosfera de plantas superiores parece otimizar as taxas de redução do C_2H_2 , através do fornecimento de substratos adicionais de carbono aos fixadores do nitrogênio. A *Rhodotorula* sp parece agir na decomposição da quitina, eliminando a cutícula do vegetal, promovendo a troca de compostos orgânicos entre as células da folha e a microflora da filosfera (RUINEN, 1966). Para o caso de cianobactérias o efeito de bactérias contaminantes tem sido atribuído a produção de substâncias (ácido indol tri-acético) com propriedades de hormônio (BUNT, 1961).

No ambiente aquático a deficiência do nitrogênio é evidenciada, geralmente, pela existência de baixa diversidade fitoplanctônica. No caso de macrófitas aquáticas, especialmente as enraizadas, o estabelecimento das comunidades parece depender muito mais de fatores ambientais como intensidade luminosa e transparência da água do que, propriamente, de altas concentrações de nitrogênio e fósforo (WETZEL, 1975). Tem sido considerado que a deficiência do nitrogênio no ambiente aquático pode causar um crescimento anômalo, mas não impede o desenvolvimento das macrófitas aquáticas (LARCHER, 1977).

Independente da concentração do nitrogênio disponível ($\text{NO}_3\text{-N}$ e $\text{NH}_4\text{-N}$) ter apresentado valores relativamente baixos para a Represa do Lobo, o conteúdo do elemento em folhas de *N. indica* foi relativamente alto. Folhas de *N. indica* têm sido consideradas como a fração que

apresenta maior concentração do nitrogênio com relação às outras partes do vegetal. Folhas mortas parecem ser a via principal de perda de nitrogênio combinado pela planta (BARBIERI, 1984).

Baseado nos valores de nitrogênio em folhas de *N. indica*, em amostras de água dos estandes da macrófita aquática, nas taxas de N_2 fixado e na contribuição de nitrogênio via filosfera, podemos considerar que o nitrogênio não representa um fator limitante para o desenvolvimento da comunidade de *N. indica*. A comunidade de macrófitas aquáticas deve dispor, além da água, de outras fontes de compostos nitrogenados. A absorção de nutrientes a partir dos sedimentos tem sido evidenciada por vários autores (BRISTOW & WHITCOMBE, 1971; BRISTOW, 1974). Além do sedimento da Represa do Lobo apresentar, normalmente, concentrações de NO_3-N e NH_4-N superiores às da coluna de água (TRINDADE, 1980), parece ser via rizosfera a principal contribuição da fixação biológica do N_2 (SANTOS et alii, 1986). Provavelmente, os sedimentos permanecem como a principal fonte de nutrientes para a comunidade de macrófitas enraizadas, as quais parecem funcionar como verdadeiras bombas de retirada de nutrientes do sedimento para a água (ESTEVES, 1980; BARBIERI, 1984).

Há uma extensa literatura discutindo a relação da provável inibição da fixação do N_2 por nitrogênio inorgânico (STEWART et alii, 1968; NEILSON et alii, 1971; FAY, 1973; FOGG et alii, 1973; STEWART et alii, 1975). A menos que altas concentrações, acima de 250 ppm, de nitrato ou amônia estejam presentes, não há inibição significativa da redução do C_2H_2 nas primeiras horas de ensaio. Isto significa, que o nitrogênio combinado não afeta a nitrogenase já existente, sendo a diminuição da atividade devido a diluição da enzima nas novas células formadas, sem que ocorra a síntese de nova enzima (STEWART et alii, 1968; STEWART et alii, 1975). Foi demonstrado que extrato de *Azotobacter* sp continua a fixar N_2 , normalmente, na

presença de amônia a níveis superiores a 40 mg/l, e que a concentração de 150 mg/l não inibiu a atividade da nitrogenase, mas sim a sua síntese (STRANDBERG & WILSON, 1968). Os mesmos resultados foram observados com *Nostoc muscorum* (STEWART et alii, 1967). Essas considerações evidenciam, que os níveis de nitrogênio combinado observados neste estudo, assim como, aqueles da maioria dos ecossistemas naturais são insuficientes para inibir, imediatamente, a fixação do N_2 ou persistir até a extinção total da nitrogenase existente. Estudos "in situ" com cianobactérias demonstram a validade de tais considerações (STEWART, 1969).

A fixação do N_2 na filosfera tem sido refletida na biomassa vegetal como um elo na cadeia da produção orgânica. Contudo, a grandeza da contribuição por microrganismos de vida livre permanece, parcialmente, obscura. Evidências recentes têm indicado que em vegetação natural o "input" de nitrogênio combinado via cianobactérias pode ser significativo (RUINEN, 1965; 1974; 1975; GOERING & PARKER, 1972; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; FINKE & SEELEY, 1978; CAPONE & TAYLOR, 1980; ZUBERER, 1982). As taxas de redução do C_2H_2 associadas com filosfera de *N. indica* foram relativamente baixas para explicar a produtividade foliar da comunidade. A fixação do N_2 por *Tolyphothrix* sp, provavelmente, torna-se mais importante em promover a proliferação de outras epífitas na filosfera. Certamente, o N_2 fixado é transferido da cianobactéria para os organismos associados (JONES & STEWART, 1968), mas a avaliação desta função requer um conhecimento maior das interações entre epífitas e hospedeiro na comunidade de macrófitas aquáticas (HARLIN, 1975).

O valor do nitrogênio fixado em rizosfera (SANTOS et alii, 1983; 1986) e filosfera de macrófitas aquáticas, é difícil de ser avaliado. Mais informações são necessárias a respeito da ciclagem do nitrogênio nas comunidades de macrófitas aquáticas, como por exemplo: a reciclagem do

nitrogênio proveniente de folhas mortas, a perda do nitrogênio por plantas vivas e a transferência do nitrogênio fixado para a macrófita aquática. Já foi evidenciado o transporte de compostos nitrogenados da rizosfera à filosfera de *Lostera marina* (McROY & GOERING, 1974). Muito ainda é preciso para determinar o destino do nitrogênio fixado, bem como, para avaliar o significado da fixação do elemento para o desenvolvimento das comunidades de macrófitas aquáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, H.L. Primary productivity, chemo-organotrophy and nutritional interactions of epiphytic algae bacteria on macrophytes in the littoral of a lake. Ecol. Monogr., 41: 97-127, 1971.
- ALLEN, M.M. & STANIER, R.Y. Selective isolation blue-green algae from water and soil. J. Gen. Microbiol., 51: 203-09, 1968.
- BARBIERI, R- Estudo da composição química de algumas espécies de macrófitas aquáticas e suas implicações no metabolismo da Represa do Lobo (Broa), SP. São Carlos, UFSCar, 1984. 225 p. (Dissertação)
- BRISTOW, J.M. & WHITCOMBE, M. The role of roots in nutrition of aquatic vascular plants. Amer. J. Bot., 58: 8-13, 1971.
- BRISTOW, J.M. Nitrogen fixation in the rizosphere of freshwater angiosperms. Can. J. Bot., 52: 217-21, 1974.
- BROUZES, R.; MAYFIELD, C.I.; KNOWLES, R. Effect of oxygen

partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy loam soil amended with glucose. Plant Soil, (Special Volum), 481-94, 1971.

BUNT, J.S. Blue-green algae, growth. Nature, London, 192: 1274-75, 1961.

CAPONE, D.G. & TAYLOR, B.F. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere of *Thalassia testudinum*. Mar. Biol., 40: 19-28, 1977.

_____. Nitrogen fixation in the rhizosphere of *Thalassia testudinum*. Can. J. Microbiol., 26: 998-1005, 1980.

CAPONE, D.G.; PENHALE, P.A.; OREMLAND, R.S.; TAYLOR, B.F. Relationship between productivity and $N_2(C_2H_2)$ fixation in a *Thalassia testudinum* community. Limnol. Oceanogr., 24: 117-25, 1979.

DARBYSHIRE, J.F. Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococum* in the presence of *Colpoda steini*. I. The influence of temperature. Soil Biol. Biochem., 4: 359-69, 1972.

DAVID, K.A.V. & FAY, P. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganism. Appl. Environ. Microbiol., 34: 640-46, 1977.

DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation in rizosphere and phyllosphere associations. In: LAUCLIA, A. & BIELESKI, R.L., ed. Inorganic plant nutrition. Berlin, Springer-Verlag, 1983. p. 330-50.

DROZD, J.W. & POSTGATE, J.R. Interference by oxygen in the acetylene-reduction test for aerobic nitrogen-fixing bacteria. J. Gen. Microbiol., 60: 427-29, 1970.

- ESTEVEZ, F.A. Die Bedeutung der aquatischen Makrophyten für den Stoffhaushalt des Schöhsees. III. Die anorganischen Hauptbestandteile der aquatischen. Makrophyten. Gewässer Abwässer, 66/67: 29-94, 1980.
- FAY, P. The heterocyst. In: CARR, N.G. & WHITTON, B.A., ed. The biology of blue-green algae. Berkeley, Univ. California Press, 1973. 238-59.
- FINKE, L.F. & SEELEY Jr., H.W. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by epiphytes of freshwater macrophytes. Appl. Environ. Microbiol., 36: 129-38, 1978.
- FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P.; WALSBY, A.E.H. The Blue-green algae. London, Academic Press, 1973. 459 p.
- GALLON, J.R. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. Trends Biol. Sci., 6: 19-23, 1981.
- GATES, D.M. Towards understanding ecosystems. Adv. Ecol. Res., 5: 1-34, 1968.
- GAZARINI, L.C. Alguns aspectos ecológicos da macrófita aquática Mayaca fluviatilis. Aublet, 1975, na Represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP). São Carlos, UFSCar, 1983. (Dissertação)
- GOERING, J.J. & PARKER, P.L. Nitrogen fixation by epiphytes on sea grasses. Limnol. Oceanogr., 17: 320-23, 1972.
- GRANHALL, U. & LUNGREN, A. Nitrogen fixation in Lake Erken. Limnol. Oceanogr., 16: 711-19, 1971.
- GRASSHOF, K. Methods of seawater analysis. New York, Verlag Chemie Weinheim, 1976. p. 117-81.

- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C.
The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory
and field evaluation. Plant Physiol., 43: 1158-207,
1968.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.D. Applications of
the acetylene-ethylene assay for measurements of nitrogen
fixation. Soil Biol. Biochem., 5: 47-81, 1973.
- HARLIN, M.M. Epiphyte-host relations in sea grasses
communities. Aquat. Bot., 1: 125-31, 1975.
- HEAD, W.D. & CARPENTER, E.J. Nitrogen fixation associated
with the marine macroalga *Codium fragile*. Limnol.
Oceanogr., 20: 815-23, 1975.
- JENSEN, V. & HOLM, E. Associative growth of nitrogen-fixing
bacteria with other microorganisms. In: STEWART,
W.D.P., ed. Nitrogen fixation by free-living
microorganisms. New York, Cambridge Univ. Press, 1975.
p. 101-19.
- JONES, K. & STEWART, W.D.P. Uptake of the extracellular
products of the nitrogen-fixing in *Calothrix scopularum*.
J. Mar. Biol., 49: 701-16, 1968.
- LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal. Barcelona, Omega, 1977.
305 p.
- MACKERET, F.J.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. Water analysis:
some revised methods for limnologists. England,
Freshwater Biological Association, 1978. 121 p.
(Scientific Publication, 36).
- MCROY, C.P. & CHANEY, B. Nitrogen fixation associated with
sea grasses. Limnol. Oceanogr., 18: 998-1002, 1973.

- McROY, C.P. & GOERING, J.J. Nutrient transfer between seagrass *Zostera marina* and its epiphytes. Nature, 248: 173-74, 1974.
- MENEZES, C.F.S. Biomassa e produção primária de três espécies de macrófitas aquáticas da Represa do Lobo (Broa), SP. São Carlos, UFSCar, 1984. 253 p. (Dissertação)
- MULDER, E.G.; LIE, T.A.; WOLDENDORP, J.W. Biology and soil fertility. In: UNESCO. Soil biology, 1969. p. 163-208.
- NEILSON, A.; RIPPKA, R.; KUNISAWA, R. Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. A Kinetic study. Arch. microbiol., 76: 139-50, 1971.
- PAERL, H.W. Role of heterotrophic bacteria in promoting N_2 fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. Microbiol. Ecology, 4: 215-31, 1978.
- PANITZ, C.M.N. Estudo comparativo do perifíton em diferentes substratos artificiais na Represa do Lobo (Broa), São Carlos, SP. São Carlos, UFSCar, 1980. (Dissertação)
- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem., 5: 109-19, 1973.
- PATRIQUIN, D.G. Nitrogen fixation (C_2H_2) associated with *Spartina alterniflora*. Ecol. Bull., 26: 20-7, 1978.
- PATRIQUIN, D. & KNOWLES, R. Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperms. Mar. Biol., 16: 49-58, 1972.
- PATRIQUIN, D.G. & KNOWLES, R. Effects of oxygen, mannitol

and ammonium concentrations on nitrogenase (C_2H_2) activity in a marine skeletal carbonate sand. Mar. Biol., 32: 49-62, 1975.

PONTES, M.C.F. Contribuição do nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado. São Carlos, UFSCar, 1988. 200 p. (Tese de Doutorado)

QUISPEL, A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland, 1974.

RICE, W.A. & PAUL, E.A. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. Can. J. Microbiol., 17: 1049-56, 1971.

RUINEN, J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. Nature, 177: 220-21, 1956.

_____. The phyllosphere, I: An ecologically neglected milieu. Plant Soil, 15: 81-109, 1961.

_____. The phyllosphere, III: Nitrogen fixation in the phyllosphere. Plant Soil, 22: 375-94, 1965.

_____. The phyllosphere, IV: Cuticle decomposition by micro-organisms in the phyllosphere. Ann. Inst. Pasteur, 111: 342-46, 1966.

_____. The phyllosphere, V. The grass sheath, a habitat for nitrogen-fixing microorganisms. Plant Soil, 33: 661-71, 1970.

_____. Nitrogen fixation in the phyllosphere. Front. Biol., 33: 167-212, 1974.

- RUINEN, J. Nitrogen fixation in phyllosphere. In: STEWART, W.D.P., ed. Nitrogen fixation by freeliving microorganisms. New York, Cambridge University Press, 1975. p. 85-99.
- SANTOS, J.E.; GAZARINI, L.C.; RODRIGUES, J.S.P.; LACAVA, P.M. Fixação do nitrogênio associada com macrófita aquática (*Mayaca fluviatilis* Aublet.). Naturalia, 8: 241-49, 1983.
- SANTOS, J.E. & LACAVA, P.M. Crescimento associativo de bactérias fixadoras de nitrogênio com outros organismos. Naturalia, 9: 15-25, 1984.
- SANTOS, J.E.; ESTEVES, F.A.; MENEZES, C.F.S.; BARBIERI, R. Fixação de nitrogênio em rizosfera de macrófitas aquáticas. Acta Limnol. Bras., 1: 341-62, 1986.
- SILVER, W.S. & JUMP, A. Nitrogen fixation associated with vascular aquatic macrophytes. In: STEWART, W.D.P., ed. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. New York, Cambridge University Press, 1975. p. 121-25.
- SOARES, J.J. Estudos sobre biomassa e produtividade do perifíton em macrófitas aquáticas na Represa do Lobo, São Carlos, SP. São Carlos, UFSCar, 1981. (Tese de Doutorado)
- SOUZA, M.H.A.O. Alguns aspectos ecológicos da vegetação na região perimetral da Represa do Lobo (Brotas-Itirapina). São Paulo, USP/IB, 1977. (Tese de Doutorado)
- STEIN, P.L. & DELWICHE, C.C. Nitrogen fixation by non-symbiotic microorganisms in some southern California soils. Environ. Sci. Technol., 4: 1122-28, 1970.
- STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation in the sea. In: COSTLOW,

- J.D., ed. Fertility of the sea. New York, Gordon & Breach, 1971. v.2, p. 537-64.
- STEWART, W.D.P. Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living microorganisms. Proc. Royal Soc., B., 172: 367-88, 1969.
- STEWART, W.D.P.; HAYSTHEAD, A.; DHARMAWARDENE, M.W.N. Nitrogen assimilation and metabolism in blue-green algae. In: STEWART, W.D.P., ed. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. New York, Cambridge University Press, 1975. p. 129-58. (IBP Hand look, 8)
- STEWART, W.D.P.; FITZGERALD, G.P.; BURRIS, R.H. Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. Archiv. Mikrobiol., 62: 336-48, 1968.
- _____. In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 58: 2071-78, 1967.
- STRANDBERG, G.W. & WILSON, P.W. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. Can. J. Microbiol., 14: 25-31, 1968.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, J.R. A manual of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Board Canada, 125, 1960.
- TRINDADE, M. Nutrientes em sedimento da Represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP). São Carlos, UFSCar, 1980. 219 p. (Dissertação)
- TUNDISI, J.G. Produção primária, "standing-stock", fracionamento e fatores ecológicos em ecossistema lacustre artificial (Represa do Broa, São Carlos). Ribeirão Preto, SP, USP/FFCL, 1977. (Tese de Livre-docência)

- WATANABE, I.; VENTURA, W.; CHOLITKUL, W.; ROGER, P.A.; KULASOORIYA, S.A. Potential of biological nitrogen fixation in Deepwater Rice. In: 1981 INTERNATIONAL DEEPWATER RICE WORK SHOP IRRI, Los Baños, Philippines, 1982. Proceedings...
- WESTLAKE, D.F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. Oxford, Blackwell, 1974. (IBP Handbook, 12)
- WETZEL, R.G. Primary productivity of aquatic macrophytes. Verh. Int. Verein. Limnol., 15: 426-36, 1964.
- _____. Limnology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975. 743 p.
- WITTY, J.F. Acetylene reduction assay can overestimate nitrogen-fixation in soil. Soil Biol. Biochem., 209-10, 1979.
- ZUBERER, D.A. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with duckweed (Lemnaceae) mats. Appl. Environ. Microbiol., 43: 823-28, 1982.

ENDEREÇO DOS AUTORES

ESTEVES, M.R.; BALLESTER, M.V.R. e SANTOS, J.E.
Universidade Federal de São Carlos
Departamento Ciências Biológicas
13560 São Carlos - SP

PONTES, M.C.F.
Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Biologia Vegetal
36570 Viçosa - MG