

ABSTRACT - NITROGEN FIXATION IN THE RHIZOSPHERE OF AQUATIC MACROPHYTES

Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by bacteria in the rhizosphere of *Nymphoides indica*, *Pontederia cordata* and in plants of *Utricularia breviscapa* was studied under anaerobic conditions at one site of Lobo Reservoir (Brotas-Itirapina, SP). Significant activities were correlated with washed root & rhizomes and unwashed plants incubated at 28 °C; high rates of acetylene reduction were observed for all glucose treatments. In the summer, the N_2 fixed per day (6.0-31.5 and 5.0-20.0 $\mu gN_2/g$ d.w.) could provide 2.0-10.0 and 1.0-2.5% of the standing stock N_2 demand of *Nymphoides indica* and *Pontederia cordata*, respectively. In the winter, it was estimated that 3.0-11.0% of the N_2 requirements *Utricularia breviscapa* could be supplied through biological N_2 fixation (2.0-3.5 $\mu gN_2/day/g$ d.w.).

INTRODUÇÃO

Diversos pesquisadores têm relatado a ocorrência de microrganismos de vida livre fixadores de nitrogênio em associação com macrófitas aquáticas. Estas associações incluem gramíneas marinhas (CAPONE & TAYLOR, 1980; CAPONE & TAYLOR, 1977; GARRET & HAYASAKA, 1982; GOERING & PARKER, 1972; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972), macroalgas marinhas flutuantes (HEAD & CARPENTER, 1975), vegetação de mangues e pântanos salinos (JONES, 1974; TEAL et al, 1979; ZUBERER & SILVER, 1978), culturas de arroz irrigado (DOMMERGUES et al, 1973; OHTA & HATTORI, 1983; WATANABE et al, 1979; YOSHIDA & ANCAJAS, 1973), gramíneas tropicais forageiras (DAY et al, 1975) e macrófitas de água doce (BRISTOW, 1974; FINKE & SEELEY, 1978; SANTOS et al, 1983a; SILVER & JUMP, 1975; ZUBERER, 1982). Nestas associações, referidas como semi-simbióticas (HARDY & HOLSTEN, 1973), os diazotróficos ocorrem como epi-

fitas nas folhas ou nas raízes das macrófitas hospedeiras. Para algumas destas interações têm sido evidenciado, que quantidades significativas de nitrogênio combinado tornam-se disponíveis às macrófitas aquáticas, via rizosfera, como resultado da atividade dos microrganismos fixadores de nitrogênio (BRISTOW, 1974; CAPONE et al, 1979; GARRET & HAYASAKA, 1982; PATRIQUIN, 1978; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; SANTOS et al, 1983a; SMITH & HAYASAKA, 1982; ZUBERER, 1982).

O propósito deste estudo foi investigar a ocorrência e extensão da fixação biológica do nitrogênio via rizosfera de macrófitas emersas e flutuantes e em plantas submersas da Represa do Lobo, bem como, fornecer uma estimativa da contribuição do elemento para a biomassa das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de plantas investigadas foram: *Nymphoides indica* (L.) O Kuntze, *Pontederia cordata* L. e *Utricularia breviscapa* Griseb caracterizadas, respectivamente, como enraizadas de folhas flutuantes, emergentes e submersas livre flutuante (SCULTHORPE, 1971). Estas macrófitas com aspectos ecológicos amplamente descritos (BARBIERI, 1984; MENEZES, 1984) foram coletadas na Represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP) caracterizada como um sistema meso-oligotrófico (TUNDISI, 1977), na região da alta-represa onde se desenvolvem em grande quantidade (Fig. 1), conferindo-lhe características tipicamente litorânea e sublitorânea (STRIXINO, 1973). As espécies de macrófitas aquáticas selecionadas, as enraizadas particularmente, sugerem importância ao ecossistema devido suas áreas de distribuição (Fig. 1) e valores significativos de biomassa e produção primária (MENEZES, 1984). As plantas foram retiradas do sedimento ou da água, transportadas para o laboratório e utilizadas experimentalmente no mesmo dia. Foram realizadas coletas mensais (3 réplicas) referentes aos meses de dezembro/1980 a fevereiro/1981, período de

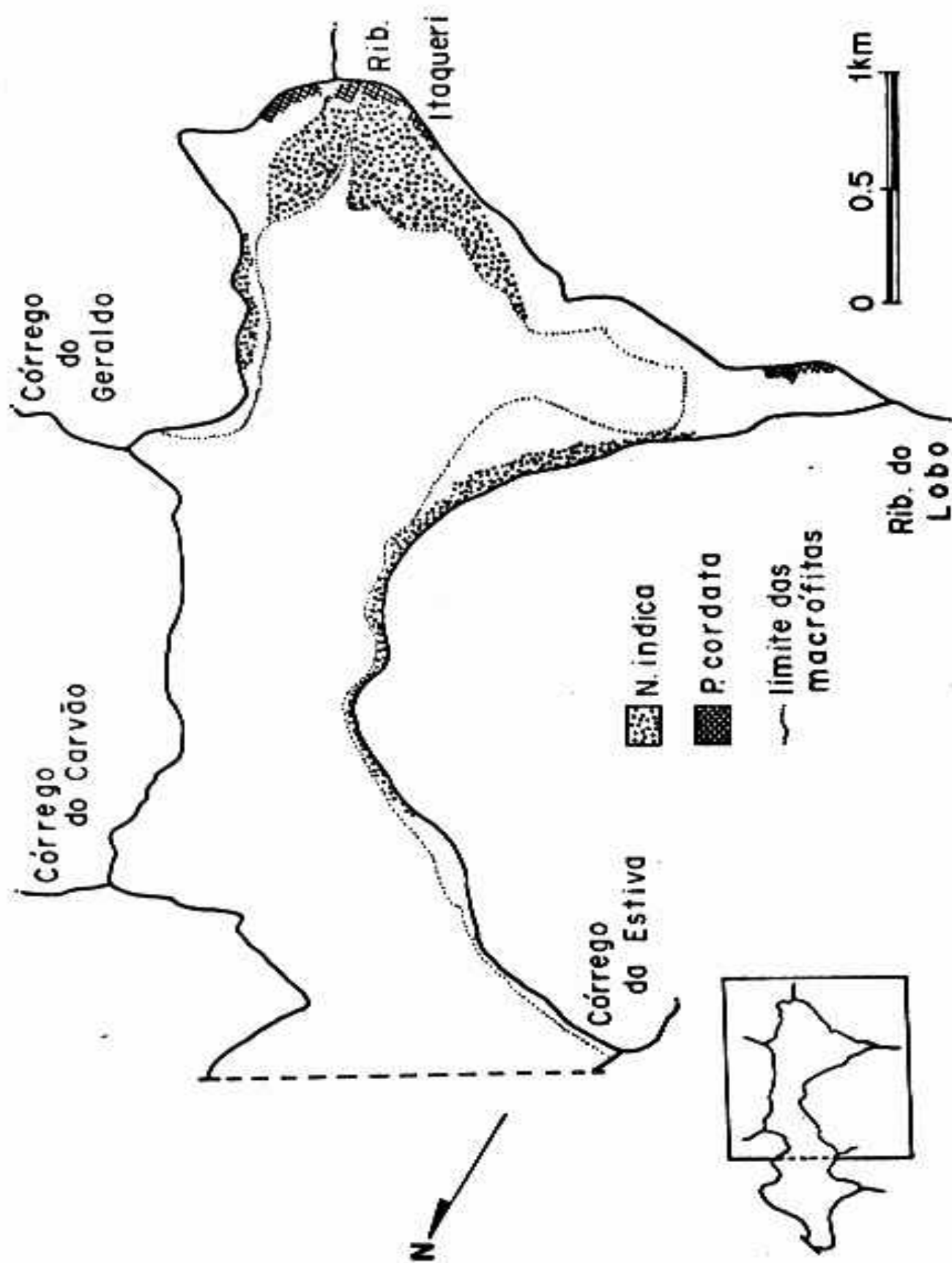


Figura 1 - Distribuição das macrófitas aquáticas estudadas na Represa do Lobo.

verão, para as plantas enraizadas, e de maio a agosto/1981 para plantas submersas, período de inverno.

A atividade da nitrogenase em plantas e rizomas & raízes utilizadas foi estimada pelo método de redução do acetileno-etileno (HARDY et al, 1968; STEWART et al, 1967). Para isso foram utilizados frascos de reação (250 ml) contendo plantas ou rizomas & raízes com e/ou sem sedimento (lavadas), água destilada e presença ou não de glicose na concentração de 2 g/100 ml (BRISTOW, 1974). O processo de labagem foi realizado até a retirada total do sedimento e perifiton aderentes as raízes e plantas, respectivamente. Os frascos de reação foram vedados com tampões de borracha, sucessivamente evacuados e submetidos a um fluxo de N_2 por um período de 3 minutos. A seguir foi adicionado acetileno num volume para fornecer uma pressão parcial de O_2 ao redor de 0.1 atmosfera (HARDY et al, 1968; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972). Foram incluídos frascos controles de dois tipos: um contendo água destilada e acetileno, outro contendo água destilada e material biológico. Em intervalo de tempo variado 0.5 ml de fase gasosa dos frascos de reação foi removida através de seringas, e o conteúdo de etileno ensaiado por cromatografia gasosa em cromatógrafo CG 370, com detector de ionização de chama, equipado com coluna de Porapak N, 1.80 m de comprimento, 1/8" de diâmetro, operada a $110^{\circ}C$ e tendo N_2 como gás de arraste. Tendo por base o requerimento de elétrons da atividade redutora do acetileno e N_2 pela nitrogenase (HARDY et al, 1973; 1968), foi estimada a concentração molar do etileno produzido (SANTOS, 1981), e os resultados finais expressos em unidades de nanomoles de C_2H_4 /hora/g (peso seco de rizomas & raízes e/ou planta).

Para estimativa da biomassa foram coletadas amostras (3 réplicas), aleatoriamente, durante o período de fevereiro/1980 a março/1981 (20), utilizando-se de um amostrador de $0,25 m^2$ de área (WESTLAKE, 1974). As amostras foram coletadas em estandes homogêneos quanto ao estado fenológico e sem ocorrência de outras espécies. A localização e a profun-

didade foram, aproximadamente, sempre as mesmas, evitando-se locais prejudicados por coletas anteriores. Parte aérea e subterrânea foram separadas, exceto em *Utricularia breviscapa* em que foi usado a planta inteira, e lavadas para a remoção de sedimento e perifíton. A seguir o material biológico foi colocado na estufa a 70 °C até obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos em gramas de peso seco/m² (gPS/m²).

O nitrogênio total, para as diferentes partes das plantas selecionadas, foi determinado segundo metodologia proposta por KJEDAHN com algumas modificações (BARBIERI, 1984). As coletas de amostras foram mensais durante o período de janeiro/1980 a fevereiro/1981. Os resultados foram expressos em gN₂/gPS/m².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas representativas do tempo de duração da redução do acetileno para *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* estão representadas nas Figs. 2, 3 e 4, respectivamente. A redução do acetileno foi observada para todos os tratamentos realizados; em condições anaeróbias rizomas & raízes sem sedimento e ou plantas não lavadas apresentaram maiores taxas de redução do acetileno, que rizomas & raízes com sedimento e ou plantas lavadas. A presença de uma fonte de carbono adicional (glicose) otimizou as taxas de redução do acetileno para todos os tratamentos efetuados. Foi evidenciado uma seqüência crescente na atividade da nitrogenase com relação aos momentos de estimativa, do tempo de duração da curva de redução do acetileno para as três espécies de macrófitas selecionadas. Não foi detectado etileno em nível significativo nos frascos controles, mesmo naqueles incubados com acetileno. Maiores taxas de redução do acetileno, em ordem crescente, estiveram associadas, respectivamente, a *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa*. Assumindo a proporção de 3

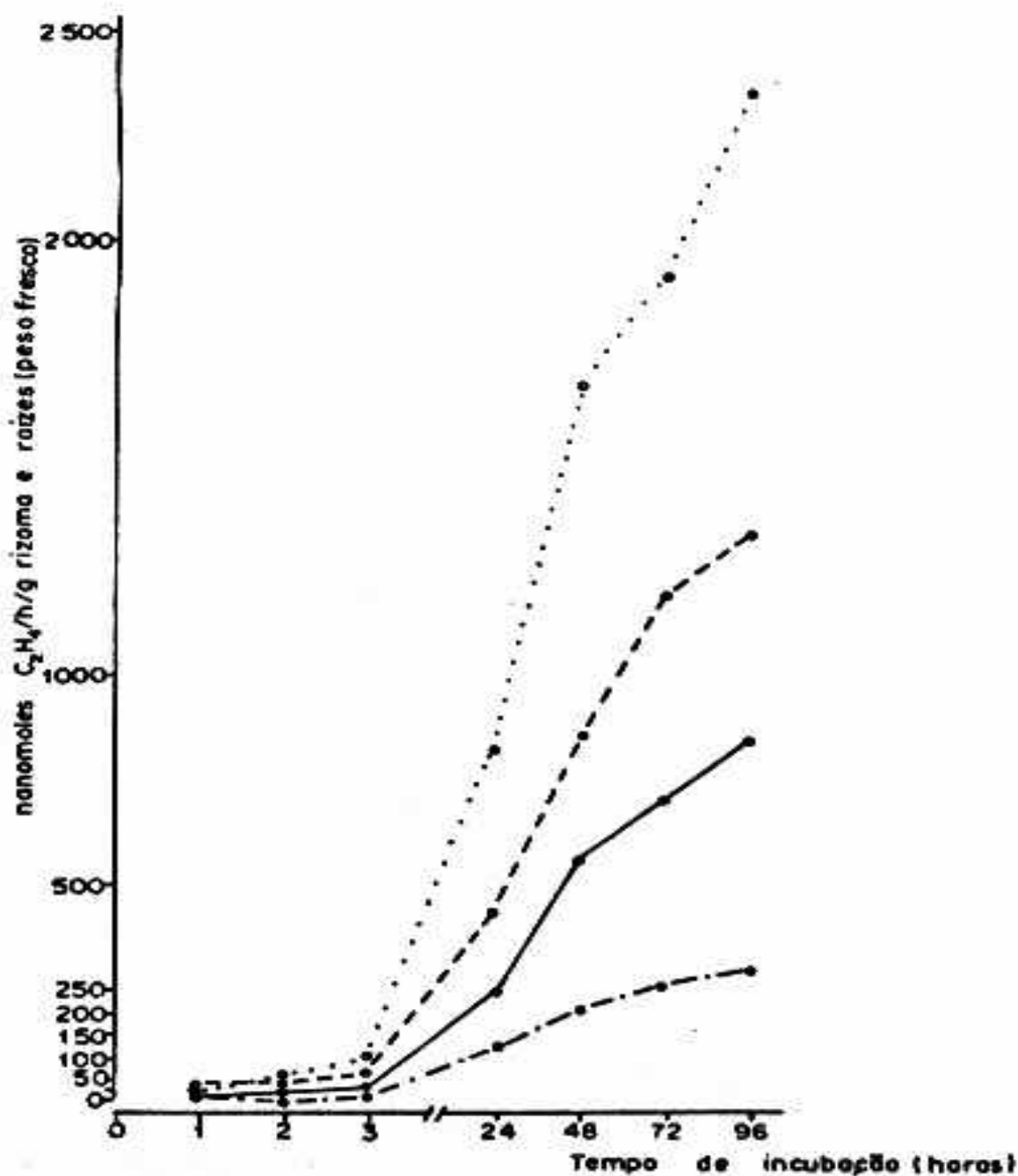


Figura 2 - Tempo de duração da redução do acetileno associado a rizoma & raízes de *Nymphoides indica* em condições anaeróbicas. Valores médios do período de verão.

- rizoma e raízes lavados
- rizoma e raízes lavados e com glicose
- .-.-••••• rizoma e raízes com sedimento
-••••• rizoma e raízes com sedimento e glicose

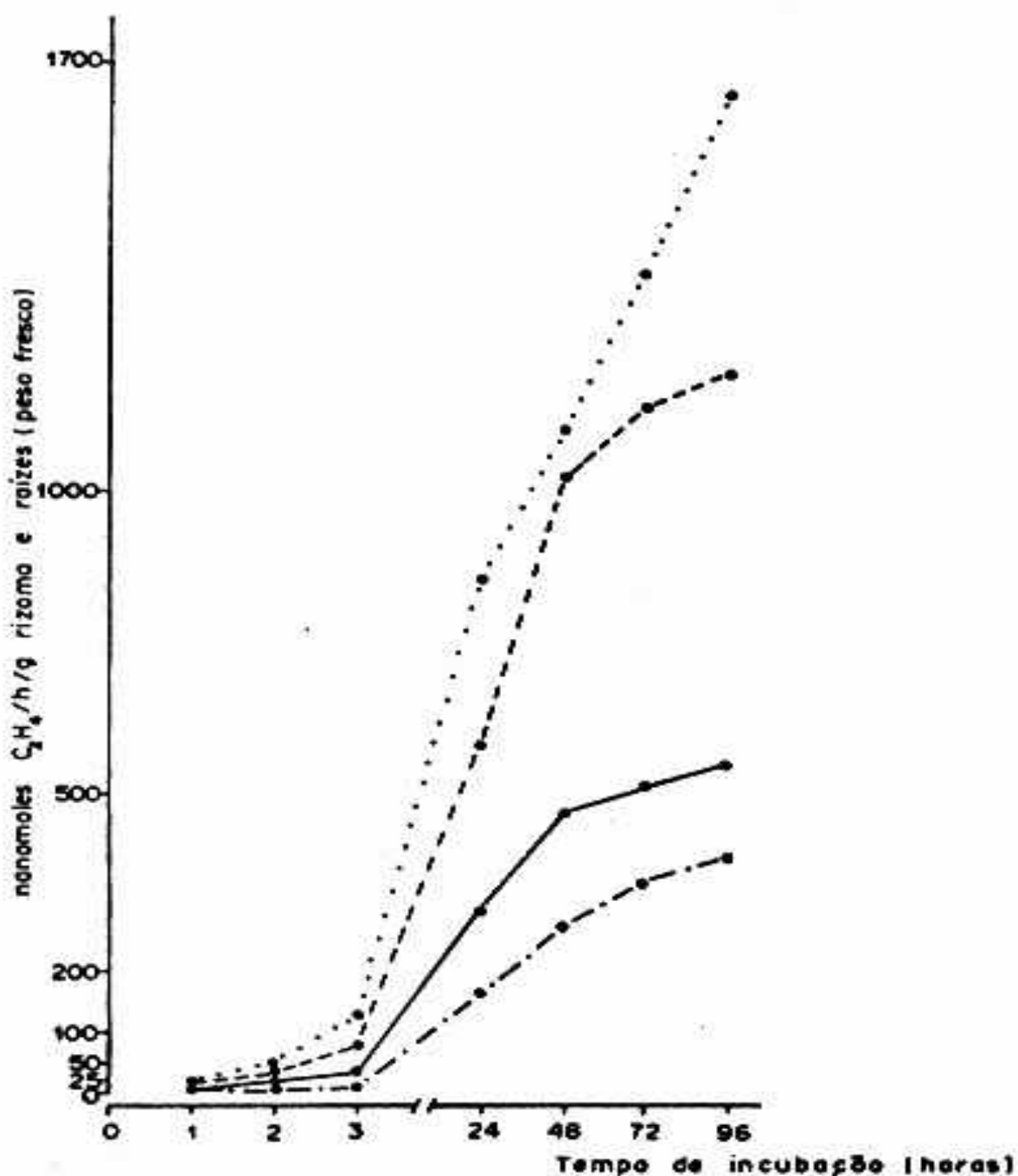


Figura 3 - Tempo de duração da redução do acetileno associado a rizoma & raízes de *Pontederia cordata* em condições anaeróbicas. Valores médios do período de verão.

- rizoma e raízes lavados
- rizoma e raízes lavados e com glicose
- .-•-.-•-.- rizoma e raízes com sedimento
-•..... rizoma e raízes com sedimento e glicose

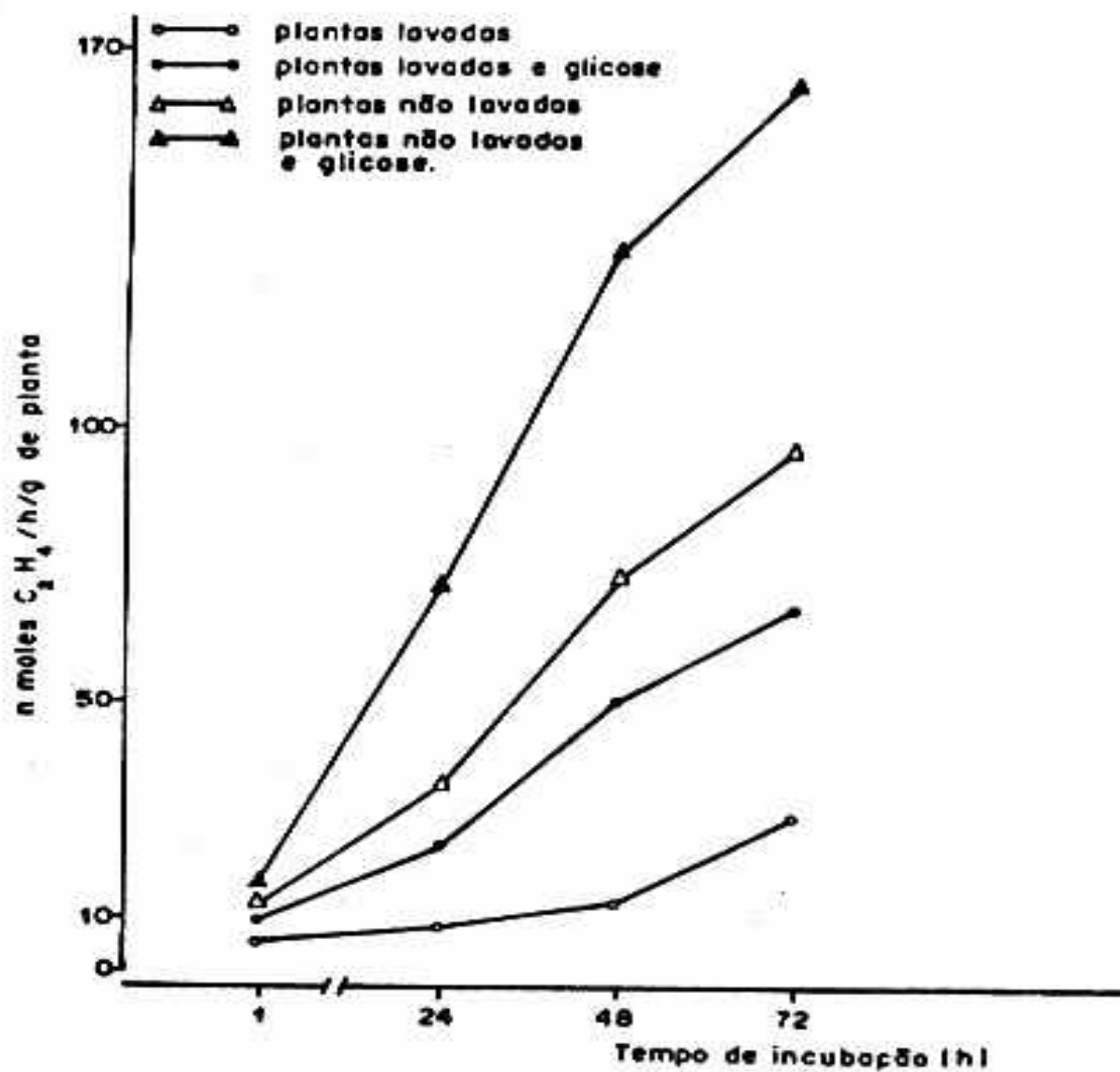


Figura 4 - Tempo de duração da redução do acetileno (valores médios do período de inverno) associado à *Utricularia breviscapa* em condições anaeróbias.

moles de C_2H_2 para um de N_2 reduzidos (HARDY et al, 1973; 1968), as taxas de nitrogênio fixado por dia apresentaram valores médios entre 6,0-31,5 e 5,0-20,0 $\mu gN_2/gPS$ para *N. indica* e *P. cordata*, respectivamente, para o período de verão; *U. breviscapa*, 2,0-3,5 $\mu gN_2/gPS$ para o período de inverno. Baseado nos valores de biomassa, conteúdo de nitrogênio das plantas e taxas do nitrogênio fixado foi possível estimar, que o processo de fixação contribui com cerca de 2,0-10,0, 1,0-2,5 e 3,0-11,0% do elemento necessário a biomassa de *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa*, respectivamente. Os valores médios mensais de biomassa, conteúdo de nitrogênio total, taxa do nitrogênio fixado e contribuição do elemento via fixação biológica para *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* estão registrados nas Tabs. 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 - Contribuição relativa do nitrogênio através do processo de fixação biológica associado a rizomas & raízes de *Nymphoides indica* para o período de verão.

Período	Biomassa* (gPS/m ²)	Conteúdo de N (gN ₂ /gPS/m ²)	Taxa N ₂ fixado* ($\mu gN_2/d/gPS$)	Contribuição do* N para biomassa (%)
dez.	162.4	6.98	15.0	2.1
jan.	70.0	2.95	31.5	10.6
fev.	28.3	0.92	6.3	6.8

* valores médios

Tabela 2 - Contribuição relativa de nitrogênio através do processo de fixação biológica associado a rizomas & raízes de *Pontederia cordata* para o período de verão.

Período	Biomassa* (gPS/m ²)	Conteúdo de N (gN ₂ /gPS/m ²)	Taxa N ₂ fixado* (µgN ₂ /d/gPS)	Contribuição do* N para biomassa (%)
dez.	227.3	3.95	5.0	1.2
jan.	382.2	11.38	20.5	1.8
fev.	280.4	7.35	18.45	2.5

* valores médios

Tabela 3 - Contribuição relativa de nitrogênio através do processo de fixação biológica associado a plantas de *Utricularia breviscapa* para o período de inverno.

Período	Biomassa* (gPS/m ²)	Conteúdo de N (gN ₂ /gPS/m ²)	Taxa N ₂ fixado* (µgN ₂ /d/gPS)	Contribuição do* N para biomassa (%)
mai.	19.9	0.53	2.0	3.8
jun.	11.2	0.30	3.5	11.6
jul.	15.7	0.42	2.9	7.0
ago.	20.9	0.55	2.2	4.0

* valores médios

Taxas significativas da redução do acetileno em rizomas & raízes lavadas de *N. indica* e *P. cordata* e em plantas

não lavadas de *U. breviscapa* foram evidenciadas, mesmo na ausência de uma fonte de carbono adicional. Tem sido considerado que a redução do acetileno observada para rizomas & raízes sem glicose, está associada com a liberação pós-morte de exudados orgânicos. Contudo, evidências da interação entre taxas de nitrogênio fixado e requerimentos do elemento por macrófitas aquáticas (BRISTOW, 1974; PATRIQUIN, 1972; SANTOS et al, 1983a; SILVER & JUMP, 1975), do efeito rizosfera no número de bactérias fixadoras de nitrogênio (PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; SANTOS, 1981) e a evidência circunstancial de que para determinadas macrófitas aquáticas a fixação do nitrogênio é a única fonte do elemento (PATRIQUIN, 1978), são consistentes com a hipótese de que a redução do acetileno em rizomas & raízes e/ou plantas lavadas está associada com a excreção de carboidratos das estruturas consideradas. As taxas de redução do acetileno observadas para *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* sugerem que associadas as mesmas, ocorre uma população ativa de bactérias fixadoras de nitrogênio, que se utilizam dos substratos carbonáceos eliminados pelas plantas. Rizosfera, particularmente, de macrófitas aquáticas tem sido considerada um habitat adequado para suportar uma variedade de diazotróficos heterótrofos da comunidade microbiológica (BRISTOW, 1974; PATRIQUIN, 1978; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; SANTOS et al, 1983a; SILVER & JUMP, 1975; ZUBERER, 1982). Os sistemas radiculares fornecem, provavelmente, ótimas condições para fixação do nitrogênio, em termos de nutrientes, gases, etc., explicando portanto as maiores taxas de redução do acetileno associadas a rizomas & raízes sem sedimento de *N. indica* e *P. cordata*. Taxas inferiores de redução do acetileno em rizomas & raízes com sedimento e/ou plantas lavadas sugerem, uma função de competição devido a presença de uma maior comunidade microbiológica no volume de solo aderente pelos carboidratos disponíveis, e pela redução da comunidade periférica no processo de lavagem, respectivamente. De modo geral, os microrganismos competem por nutrientes, vitaminas e fatores

de crescimento, mas basicamente, a competição se estabelece em relação a um substrato energético adequado (CLARK, 1969). Estas considerações são suportadas pela otimização das taxas de redução do acetileno de *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* na presença de uma fonte de carbono adicional para os diferentes tratamentos realizados; resultados semelhantes foram relatados em diversos estudos com macrófitas aquáticas (BRISTOW, 1974; PATRIQUIN, 1972; SANTOS et al, 1983a; 1983c; SILVER & JUMP, 1975).

Os experimentos com *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* foram realizados em anaerobiose, podendo assim terem sido subestimados os valores em percentagem da contribuição do processo de fixação do nitrogênio com relação a biomassa das macrófitas. Tem sido evidenciada maior atividade da nitrogenase associada a gramíneas marinhas em condições aeróbias (PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; SMITH & HAYASAKA, 1982), sugerindo que a atividade da enzima possa ser compartimentalizada dentro da célula e ser protegida da inativação pelo oxigênio, ou ainda, que a eficiência de diazotróficos facultativos e ou aeróbios é favorecida por tensões reduzidas de oxigênio na rizosfera de macrófitas aquáticas (ZUBERER, 1982; ZUBERER & SILVER, 1978). Bactérias associadas a rizomas & raízes podem fixar nitrogênio aerobicamente, e dependem da planta para a obtenção de substratos carbonáceos e oxigênio, como foi evidenciado para *S. alterniflora* (PATRIQUIN, 1978), em algumas gramíneas tropicais (DUBERINER & DAY, 1976) e em *T. testudinum* (OREMLAND & TAYLOR, 1977). Contudo, um fator comum às macrófitas enraizadas *N. indica* e *P. cordata* é a natureza anaeróbia da zona de crescimento das raízes. O sedimento é tipicamente preto, rico em matéria orgânica e nutrientes (TRINDADE, 1980) e na ausência de glicose e acetileno liberou metano quando ensaiado por cromatografia gasosa (SANTOS et al, 1983b). Este habitat é semelhante ao descrito para *Typha* sp e *Glyceria* sp, gêneros em que a fixação do nitrogênio via rizosfera foi bem estabelecida (BRISTOW, 1974). Embora a redução do acetileno

possa ser resultante da presença de microrganismos fixadores de nitrogênio nos sedimentos (SANTOS et al, 1983b), parece que a presença de sistema radiculares aumentam as taxas de redução do acetileno em função da abundância de fontes orgânicas de energia (PATRIQUIN, 1978; TEAL et al, 1979).

A macrófita submersa *U. breviscapa*, cuja rizosfera é constituída por um ambiente relativamente aeróbio, foi também ativa em condições anaeróbias. Este fato pode, provavelmente, ser reflexo da própria situação da macrófita coletada em regiões relativamente rasas e com grande densidade de indivíduos. Tem sido relatado que a pressão parcial ótima do oxigênio para redução do acetileno, é função da tensão do oxigênio nas raízes do estoque de macrófitas aquáticas (SILVER & JUMP, 1975). De qualquer modo, não resta dúvida que para *U. breviscapa* as taxas de redução do acetileno são predominantemente heterótroficas, semelhantes àquelas evidenciadas pela associação de bactérias epifíticas em macrófitas aquáticas de lagos, reservatórios e rios (SANTOS et al, 1983a; 1983c; SILVER & JUMP, 1975).

Embora a fixação do nitrogênio em condições anaeróbias para *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* possa ter sido subestimada, nem todo o nitrogênio fixado torna-se disponível ao crescimento das mesmas. Ocorrem perdas para a coluna de água e também para os sedimentos através da desnitrificação (KAPLAN et al, 1977). Este processo, particularmente, necessita ser investigado desde que o oxigênio na rizosfera pode estimular a nitrificação e portanto fornecer substratos para a desnitrificação.

Não foi possível correlacionar a fixação do nitrogênio em *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* em função da sazonalidade. Para regiões temperadas tem sido evidenciado que maior atividade da nitrogenase ocorre durante o período de verão (CAPONE & TAYLOR, 1980; SMITH & HAYASAKA, 1982). Em nossos experimentos, *N. indica* e *P. cordata* tiveram o processo de fixação do nitrogênio estimado durante o período de verão, e *U. breviscapa* durante o inverno. Baseado nos

valores de crescimento relativo, produtividade e mortalidade foi considerado que as três espécies de macrófitas selecionadas, apresentam a tendência de aumentar seus valores de biomassa nos meses de verão (MENEZES, 1984); os valores maiores estiveram sempre relacionados a *P. cordata*. Entre as macrófitas enraizadas *N. indica* apresentou maiores variações nas taxas de fixação do nitrogênio e contribuição em termos do fornecimento do elemento que *P. cordata*, provavelmente, em função de maiores áreas de ocupação na represa, taxa de crescimento relativo e produtividade e menor valor de nitrogênio em estoque, tornando-a mais dependente do processo de fixação do nitrogênio. Ao mesmo tempo, *N. indica* apresentou um sistema radicular mais desenvolvido que *P. cordata*. Este fato representa uma contradição para algumas relações evidenciadas entre biomassa subterrânea e fixação do nitrogênio, devido a abundância de bactérias redutoras do tetrazolium na córtex de *S. alterniflora* (PATRIQUIN, 1978; TEAL et al, 1979). Baseado nas taxas de nitrogênio fixado e nos valores de contribuição do elemento para biomassa de *N. indica* e *P. cordata*, podemos considerar que o estoque de macrófitas enraizadas parece demonstrar pouca dependência com relação ao processo de fixação do nitrogênio. Tais considerações são baseadas na reconhecida capacidade das macrófitas enraizadas absorverem nutrientes da água e sedimento, em concentrações baixa (MENEZES, 1984) e alta (TRINDADE, 1980), respectivamente. Provavelmente, os sedimentos permanecem como a principal fonte de nutrientes para a comunidade de macrófitas enraizadas (BARBIERI, 1984), as quais parecem funcionar como verdadeiras "bombas" de retirada de nutrientes do sedimento para água (BARBIERI, 1984; ESTEVES, 1980).

Devido a acentuada redução dos valores de biomassa no período de dezembro a janeiro, por influência de parâmetros ecológicos (MENEZES, 1984), *U. breviscapa* foi utilizada experimentalmente no período de inverno. A ausência de um habitat semelhante a rizosfera não impossibilitou a evidência de taxas mensuráveis de fixação de nitrogênio. Estas

apesar de baixas, se converteram em altos valores de contribuição do nitrogênio para a biomassa de *U. breviscapa*, da mesma ordem que os verificados para *N. indica*. Estes resultados são suportados pela alta produtividade de *U. breviscapa* em relação as macrófitas enraizadas, apesar dos seus baixos valores de biomassa e excreção de substratos orgânicos (MENEZES, 1984). Contudo, *U. breviscapa* apresenta elevados teores de nitrogênio, comprovando sua eficiência em captar e concentrar o elemento, mesmo em águas relativamente pobres no elemento (BARBIERI, 1984). De qualquer modo, o processo de fixação biológica do nitrogênio pode auxiliar a aparente deficiência do nitrogênio para águas da região da represa. Provavelmente, a principal fonte do elemento para *U. breviscapa* parece ser o nitrogênio contido na água. Sua dependência pelos nutrientes da água, torna seu comportamento nutricional semelhante ao do fitoplâncton. A imobilização dos nutrientes pelos dois compartimentos biológicos parece explicar a aparente oligotrofia do nitrogênio combinado para essa região da represa.

Esta investigação demonstrou que a comunidade de macrófitas aquáticas suporta uma população microbiológica capaz da fixação do nitrogênio. Esta população constituída, predominantemente, de bactérias fixadoras de nitrogênio é responsável por parte do elemento necessário ao crescimento das macrófitas aquáticas selecionadas. As estimativas determinadas não devem ser tomadas como números exatos. O potencial reprodutivo de *N. indica*, *P. cordata* e *U. breviscapa* não pode ser explicado unicamente pela contribuição via fixação biológica do nitrogênio. Contudo, não há dúvidas da importância dessa contribuição em águas deficientes do elemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI, R. Estudo da composição química de algumas espécies de macrófitas aquáticas e suas implicações no metabolismo da Represa do Lobo (Broa). São Carlos, UFSCar, 1984. 225p. Tese Mestrado.
- BRISTOW, J.M. Nitrogen fixation in rhizosphere of fresh water angiosperms. Can. J. Bot., 52: 212-21, 1974.
- 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.
- 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.
- CLARK, F.E. Ecological associations among soil microorganisms. Soil Biol., 9: 125-61, 1969.
- DAY, J.M.; NEVES, M.C.P. & DOBEREINER, J. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. Soil Biol. Biochem., 7: 107-12, 1975.
- DOBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1, Washington, 1974. Proceedings... Washington, Washington State University, 1974. p. 518-38.

- DOMMERGUES, Y.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, G.; WEINHARD, P. Nonsymbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. Soil Biol. Biochem., 5: 83-9, 1973.
- ESTEVEZ, F.A. Die Bedeutung der aquatischen Makrophyten für den Stoffhaushalt des Schöhsees. III. Die anorganischen Hauptbestandteile der aquatischen Makrophyten. Gewässer und Abwässer, 66/67: 29-94, 1980.
- FINKE, L.R. & SEELEY JR., H.W. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by epiphytes of freshwater macrophytes. Appl. Environ. Microbiol., 36: 129-38, 1978.
- GARRET, W.S. & HAYASAKA, S.A. Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. Appl. Environ. Microbiol., 43: 1244-8, 1982.
- GOERING, J.J. & PARKER, P.I. Nitrogen fixation by epiphytes on seagrasses. Limnol. Oceanogr., 17: 320-3, 1972.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem., 5: 47-81, 1973.
- HARDY, R.W.F. & HOLSTEN, R.D. Global nitrogen cycling. In: BALLANTYNE, R.K. & GUARRAYA, L.J. The aquatic environment microbial transformations and water quality. Washington, DC, 1973.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation laboratory and field evaluation. Plant Physiol., 43: 1185-207, 1968.
- HEAD, W.D. & CARPENTER, E.J. Nitrogen fixation with the marine macroalga *Codium fragile*. Limnol. Oceanogr., 20: 815-23, 1975.

- JONES, K. Nitrogen fixation in a salt marsh. J. Ecol., 62: 553-65, 1974.
- KAPLAN, W.A.; TEAL, J.M.; VALIELA, I. Denitrification in salt marsh sediments: evidence for seasonal temperature selection among populations of denitrifiers. Microb. Ecol., 3: 193-204, 1977.
- MENEZES, C.F.S. Biomassa e produção primária de três espécies de macrófitas aquáticas da Represa do Lobo (Broa). São Carlos, UFSCar, 1984. 253p. Tese Mestrado
- OHTA, H. & HATTORI, T. Nitrogen fixation by oligotrophic bacteria on the flood rice roots. Soil Sci. Plant Nutr., 29: 355-62, 1983.
- OREMLAND, R.S. & TAYLOR, B.F. Diurnal fluctuations of O₂, N₂ and CH₄ in the rhizosphere of *Thalassia testudinum*. Limnol. Oceanogr., 22: 566-70, 1977.
- PATRIQUIN, D. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with cord grass *Spartina alterniflora* Loisel. Ecol. B., 26: 20-7, 1978.
- PATRIQUIN, D. The origin of nitrogen and phosphorus for growth of the marine angiosperm *Thalassia testudinum*. Mar. Biol., 15: 35-46, 1972.
- PATRIQUIN, D. & KNOWLES, R. Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperms. Mar. Biol., 16: 49-58, 1972.
- SANTOS, J.E. Fixação de nitrogênio em rizosfera de macrófitas aquáticas (Represa do Lobo, Brotas - Itirapina, SP). São Carlos, UFSCar, 1981. Tese Doutorado

- SANTOS, J.E.; GAZARINI, L.C.; LACAVA, P.M.; MAINTINGUER, S.I.
 Fixação de nitrogênio em *Utricularia* sp. In: SEMINÁRIO REGIONAL DE ECOLOGIA, 3, São Carlos, 1983. Anais... São Carlos, UFSCar, 1983. p. 127-33.
- SANTOS, J.E.; GAZARINI, L.C.; LACAVA, P.M.; TENDOLIN, R.M.
 Fixação do nitrogênio em sedimento lacustre. In: SEMINÁRIO REGIONAL DE ECOLOGIA, 3, São Carlos, 1983. Anais... São Carlos, UFSCar, 1983. p. 79-85.
- SANTOS, J.E.; GAZARINI, L.C.; RODRIGUES, J.S.P.; LACAVA, P.M.
 Fixação de nitrogênio associada com macrófita aquática (*Mayaca fluviatilis* Aublet). Naturalia, 8: 241-9, 1983.
- SCULTHORPE, C.D. The biology of aquatic vascular plants. London, Edward Arnold, 1971. 610p.
- SILVER, W.S. & JUMP, A. Nitrogen fixation associated with vascular aquatic macrophytes. In: STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation by free living microorganisms. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1971. p. 121-5.
- SMITH, G.W. & HAYASAKA, S.S. Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. Appl. Environ. Microbiol., 43: 1244-8, 1982.
- STEWART, W.D.P.; FITZGERALD, G.P.; BURRIS, R.H. In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 58: 2071-8, 1967.
- STRIXINO, G.B.M.A. Sobre a ecologia dos macroinvertebrados do fundo da Represa do Lobo. São Paulo, Instituto de Biociências, USP, 1973. Tese Doutorado.
- TEAL, J.M.; VALIELA, I.; BERLO, D. Nitrogen fixation by rhizosphere and free-living bacteria in salt marsh

- sediments. Limnol. Oceanogr., 24: 126-32, 1979.
- TRINDADE, M. Nutrientes em sedimento da Represa do Lobo (Brotas - Itirapina, SP). São Carlos, UFSCar, 1980. Tese Mestrado.
- TUNDISI, J.G. Produção primária, "standing-stock", fracionamento do fitoplâncton e fatores ecológicos em ecossistema lacustre artificial (Represa do Broa). Ribeirão Preto, FFCL, 1977. Tese Livre-Docência
- WATANAVE, L.; BARRAQUIO, W.L.; GUZMAN, M.R.; CABRERA, D.A. Nitrogen fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen fixing bacteria associated with wetland rice. Appl. Environ. Microbiol., 37: 813-9, 1979.
- WESTLAKE, D.F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. Blackwell. Oxford, Blackwell, 1974. (IBP Handbook, 12)
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R. Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields. Soil Sci. Am. Proc., 37: 42-6, 1973.
- ZUBERER, D.A. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with duckweed (Lemnaceae) mats. Appl. Environ. Microbiol., 43: 823-8, 1982.
- ZUBERER, D.A. & SILVER, W.S. Biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) associated with Florida mangroves. Appl. Environ. Microbiol., 35: 567-75, 1978.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro e aos colegas do Laboratório de Limnologia da UFSCar pelas valiosas críticas e sugestões.

ENDEREÇO DOS AUTORES

SANTOS, J.E.; ESTEVES, F.A. e MENEZES, C.F.S.
Laboratório de Limnologia
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal de São Carlos
13560 São Carlos - SP

BARBIERI, R.
Labohidro
Universidade Federal do Maranhão
Praça Gonçalves Dias, 21
65000 São Luiz - MA

