



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

EDILÂNDIA FARIAS DANTAS

**SIMBIOSE ENTRE ALGAROBA E RIZÓBIOS NATURALMENTE
ESTABELECIDOS EM SOLOS DE PERNAMBUCO: POTENCIAL DE APORTE DE
NITROGÊNIO**

Recife

2022

EDILÂNDIA FARIAS DANTAS

**SIMBIOSE ENTRE ALGAROBA E RIZÓBIOS NATURALMENTE
ESTABELECIDOS EM SOLOS DE PERNAMBUCO: POTENCIAL DE APORTE DE
NITROGÊNIO**

Tese Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio

Coorientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra

Recife

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

- D192s Dantas, Edlândia Farias.
Simbiose entre algaroba e rizóbios naturalmente estabelecidos em solos de Pernambuco: potencial de aporte de nitrogênio. / Edlândia Farias Dantas. – 2022.
58 f.: il.
- Orientador: Prof. Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.
Inclui referências.
1. Engenharia nuclear. 2. *Prosopis juliflora*. 3. Fixação biológica de nitrogênio. 4. Nodulação. I. Sampaio, Everardo Valadares de Sá Barretto (orientador). II. Lyra, Maria do Carmo Catanho Pereira de (coorientadora). III. Título.

621.48 CDD (22. ed.)

UFPE
BCTG/2022-115

EDILÂNDIA FARIAS DANTAS

**SIMBIOSE ENTRE ALGAROBA E RIZÓBIOS NATURALMENTE
ESTABELECIDOS EM SOLOS DE PERNAMBUCO: POTENCIAL DE APORTE DE
NITROGÊNIO**

Tese Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e Meio-Ambiente.

Aprovado em: 23/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Valadares de Sa Barretto Sampaio
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior (Examinador Externo)
EMBRAPA SEMIARIDO

Dr. Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso (Examinador Externo)
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Rômulo Simões Cezar Menezes
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico ao meu pai (in memória), Edson Dantas que sonhou comigo essa conquista ainda em vida. A minha amada e magnífica mãe, Maria Salustiano de Farias Dantas que não mede esforços para que juntas possamos realizar os nossos sonhos. Ao meu filho, Jussî de Souza Dantas Filho que com seu jeito único e singelo de ser me motiva diariamente para que eu possa continuar nessa jornada chamada Vida. A vocês, todo meu amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, da sabedoria, e acima de tudo o dom do amor.

Aos meus pais, Edson (in memória) e Maria Salustiano, pela confiança, ensinamentos, exemplos de vida, amor incondicional e recíproco. Ao meu filho, Jussê Filho que me incentiva na busca desse objetivo. Amo-te Filho.

A Dácio Neto por toda dedicação, carinho e companheirismo.

A minha orientadora Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela orientação, amizade, carinho, respeito e atenção. Sou, imensamente, grata pela sua orientação. A ciência, o mundo e o universo precisam de mulheres como você.

Ao meu orientador prof. Doutor Everardo, por ser um grande ser humano e majestoso orientador. Agradeço por toda sua sensibilidade em identificar os pontos fortes e fracos dos seus alunos e encaminhá-los na ciência de forma simples e objetiva.

A minha orientadora Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela orientação, amizade, carinho, respeito e atenção. Sou, imensamente, grata pela sua orientação. A ciência, o mundo e o universo precisam de mulheres como você.

A Dr^a Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, pela amizade, atenção e sabedoria e pelo convívio enriquecedor durante esse período.

À Associação Plantas do Nordeste (APNE), na pessoa de Frans Pareyn que teve grande colaboração na execução desse projeto.

A José Ribeiro da Silva Neto, por sempre estar disponível em ajudar o próximo e por ser um excelente profissional. Sua atuação e contribuição em campo foi crucial para execução desse projeto. Obrigado por todo ensinamento.

Aos bolsistas de iniciação científica, Alesson e Alexandre, pela dedicação e apoio dado durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e profissionais do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio meu muito obrigada por cada momento compartilhado, pelo convívio, por todo ensinamento e contribuição nesse projeto.

Aos meus amigos e profissionais do grupo de Biomassa – UFPE obrigada pela parceria e incentivo.

Aos inúmeros amigos e voluntários que me ajudaram na execução desse projeto, principalmente aos que contribuíram nas coletas nos Algarobais que foram cruciais para esse resultado.

Ao laboratório de Ecologia isotópica na USP pelas análises isotópicas.

Ao laboratório de Biomassa na UFPE pelo suporte em todas as análises.

Ao CRNC na pessoa do prof. DR^o Elvis França pela disponibilidade nas análises nutricionais de planta e solo.

Aos membros da banca examinadora, Dr^o. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio, Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Dr^o. Rômulo Simões Cezar Menezes, Dr^o Paulo Ivan Fernandes Júnior, Dr^o Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso, Dr^o Ana Dolores Santiago de Freitas e o Dr^o Luiz Antônio Martinelli, pelas valiosas contribuições.

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de ingressar no doutorado.

Ao Programa de Tecnologias Energéticas e Nucleares, por todo conhecimento adquirido e por toda a credibilidade.

A FACEPE pela ajuda financeira por meio da concessão da bolsa.

Aos amigos pela torcida e companheirismo.

RESUMO

A algaroba, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC., é uma leguminosa capaz de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Existem mais de 67 mil hectares de algarobais espontâneos em Pernambuco, não há estimativas das quantidades de N que eles aportam e dos fatores que podem regular a eficiência da simbiose e nem são conhecidas as características das populações de rizóbios nativos neste algarobais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi gerar uma melhor compreensão do processo de FBN em algarobais naturalmente estabelecidos em Pernambuco. Foram escolhidos seis algarobais, em diferentes municípios para avaliação da biomassa das árvores e quantificação do N aportado via FBN, utilizando a técnica da abundância natural. As biomassas foram estimadas e amostras de solo e plantas foram coletadas em cinco parcelas de 20 m X 20 m, em cada área. Um experimento em casa de vegetação foi conduzido com solo das seis áreas, cultivando algaroba como planta isca. Nodulação ocorreu nas plantas cultivadas nos solos de todas as áreas, comprovando a existência de populações de bactérias capazes de nodular a algaroba. Fixação biológica de nitrogênio ocorreu em cinco das áreas (Ibimirim, Tuparetama, Terra Nova e Ouricuri e Parnamirim) mas não em Floresta. Esta ausência da FBN não pode ser explicada pela ausência de rizóbios no solo, cuja presença foi comprovada no experimento de casa-de-vegetação. As proporções de N fixado nas folhas variaram de 24 a 71% nas cinco áreas, correspondendo a 5 a 66 kg ha⁻¹, sendo maior em Ibimirim, devido à maior biomassa foliar. Extrapolando a quantidade média fixada apenas nas folhas (28,6 kg ha⁻¹) para os 67 mil hectares estima-se um aporte anual de 2 Gg de N nos algarobais naturalmente estabelecidos em Pernambuco.

Palavras-chave: *Prosopis juliflora*; fixação biológica de nitrogênio; nodulação.

ABSTRACT

Mesquite, *Prosopis juliflora* (Sw) DC, is a leguminous tree capable of biological nitrogen fixation (BNF). There are more than 67 thousand hectares of spontaneous *P. juliflora* populations in Pernambuco state, Brazil, and there are no estimates of the amounts of N they fix and of the factors that regulate the efficiency of the symbiosis, and the characteristics of the native rhizobia populations that nodulate them are not known. Therefore, the objective of this work was to generate a better understanding of the FBN process in naturally established *P. juliflora* populations in Pernambuco. Six populations in different municipalities were chosen to evaluate the plant biomass and quantify the N supplied via FBN, using the natural abundance technique. Biomasses were estimated and soil and plant samples were collected in five 20 m X 20 m plots in each area. A greenhouse experiment was conducted with soil from the six areas, growing *P. juliflora* seedlings as bait plants. Nodulation occurred in plants grown in soils from all areas, proving the existence of bacteria populations capable of nodulating *P. juliflora*. Biological nitrogen fixation occurred in five of the municipalities (Ibimirim, Tuparetama, Terra Nova, Ouricuri and Parnamirim) but not in Floresta. This absence of BNF cannot be explained by the absence of Rhizobia in the soil, whose presence was confirmed in the greenhouse experiment. The proportions of N fixed in the leaves varied from 24 to 71% in the five areas, corresponding to 5 to 66 kg ha⁻¹, and being highest in Ibimirim, due to the highest leaf biomass. Extrapolating the average N amount fixed only in the leaves (28.6 kg ha⁻¹) to the 67 thousand hectares of naturally established populations of *P. juliflora* in Pernambuco state, the annual contribution was estimated to be 2 Gg of N.

Keyword: *Prosopis juliflora*; biological nitrogen fixation; nodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa com localização das áreas de coleta que foram estudadas no semiárido de Pernambuco.	23
Figura 2 –	Imagens aéreas com drone de área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Floresta, Pernambuco.	24
Figura 3 –	Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Ibimirim, Pernambuco.	25
Figura 4 –	Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Ouricuri, Pernambuco.	25
Figura 5 –	Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Parnamirim, Pernambuco.	26
Figura 6 –	Imagem da área para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Terra Nova, Pernambuco.	26
Figura 7 –	Imagem aérea com drone estudo da área escolhida para estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Tuparetama, Pernambuco.	27
Figura 8 –	Desenvolvimento da algaroba cultivada em diferentes solos em casa de vegetação no DEN-UFPE.	32
Figura 9 –	Variedades de nódulos de algaroba cultivado em diferentes solos em casa de vegetação.	32
Figura 10 –	Análise da Biomassa seca da raiz x Biomassa seca da parte aérea de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.	45
Figura 11 –	Análise da Biomassa seca total da planta x nº de nódulos de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.	45
Figura 12 –	Nº de nódulos x Peso seco de nódulos de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Granulometria, pH, C total, N total e concentrações de P, Ca, Mg, Na, Al, K, H extraíveis, de diferentes algarobais espontâneos em áreas de municípios do sertão de Pernambuco.	28
Tabela 2 – Diâmetro altura do peito, número de ramos altura, número de indivíduos por parcela, área basal no peito e indivíduos por hectares de diferentes algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.	35
Tabela 3 – Biomassa aérea verde da planta, biomassa aérea seca e biomassa de folhas de diferentes algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.	36
Tabela 4 – Concentração de N, quantidade de N, $\delta^{15}\text{N}$ de algaroba, $\delta^{15}\text{N}$ médio de plantas referências, Nitrogênio derivado da atmosfera (%) e N fixado (kg ha^{-1}) das diferentes áreas de algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.	39
Tabela 5 – Concentrações de C, N, P, K, Na, Ca, relação C/N e relação N/P nas folhas de diferentes algarobais espontâneos no Sertão de Pernambuco	42
Tabela 6 – Número de nódulos, peso seco de nódulos, peso seco de raiz, peso seco da parte aérea e biomassa total de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.	44
Tabela 7 – Caracterização fenotípicas das bactérias de nódulos de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.	46
Tabela 8 – Presença de muco nos isolados das bactérias de nódulos de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Prosopis juliflora (Sw.) DC	14
2.2	Fixação biológica de nitrogênio	16
2.3	Técnicas isotópicas	18
2.4	Fixação biológica de nitrogênio em <i>Prosopis</i> spp.	20
2.5	Equações alométrica para estimativa da biomassa de <i>P. juliflora</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Área de estudo em algarobais estabelecidos no semiárido pernambucano	23
3.1.1	Descrição das áreas	24
3.1.1.1	<i>Floresta</i>	24
3.1.1.2	<i>Ibimirim</i>	24
3.1.1.3	<i>Ouricuri</i>	25
3.1.1.4	<i>Parnamirim</i>	25
3.1.1.5	<i>Terra Nova</i>	26
3.1.1.6	<i>Tuparetama</i>	27
3.2	Estimativa da biomassa	27
3.3	Coleta e caracterização do solo nos algarobais	28
3.4	Coleta e avaliação do estado nutricional das plantas nos algarobais	29
3.5	Estimativa da fixação biológica de nitrogênio nos algarobais	29
3.6	Experimento de planta isca	31
3.7	Análise estatística	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Biomassa dos algarobais	35
4.2	Estimativa da fixação biológica de nitrogênio	38
4.3	Concentração de nutrientes nas amostras de folhas dos algarobais	41
4.4	Experimento de planta isca	43
5	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

As fontes energéticas de biomassa são recursos naturais renováveis, contribuindo para a redução do uso de combustíveis fósseis e, conseqüentemente, para a redução das mudanças climáticas. A algaroba, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC., destaca-se na produção de biomassa vegetal, além de fornecer estacas, álcool, melaço e forragem (RIBASKI et al., 2009). É uma espécie introduzida no Brasil há mais de 50 anos, principalmente no Nordeste brasileiro, por ser uma boa forrageira e ser adaptada a locais secos (SILVA et al., 2001), (RIBASKI et al., 2009). No Nordeste, estima-se que existam mais de 500 mil hectares de algarobais, utilizados para fins energéticos e forrageiros (LIMA, 2005). A lenha de algaroba é considerada o biocombustível mais atrativo na região nordestina (DE MATTOS CARNEIRO JÚNIOR et al., 2021).

Em Pernambuco, existem mais de quatro mil áreas de algarobais estabelecidos por disseminação natural, geralmente em baixios e várzeas, que perfazem mais de 67 mil hectares (RIEGELHAUPT, 2014). São usados pela população sertaneja para geração de renda, com a venda da lenha, principalmente para uso como combustível, e das vagens, para alimentação animal, promovendo a economia local nos períodos de seca, quando chega a ser a principal renda (RIEGELHAUPT, 2014; RODRIGUES et al, 2013).

A algaroba é uma leguminosa capaz de se beneficiar do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) em simbiose com bactérias diazotróficas (SCAMBATO, 2013). O processo de FBN é de suma importância para a região, pois a maioria dos seus solos apresenta baixos teores de N, devido à baixa produção de biomassa vegetal e à rápida mineralização da matéria orgânica (SALCEDO, SAMPAIO, 2008). A reposição do N se dá principalmente por meio da FBN das associações de leguminosas com rizóbios (FREITAS E SAMPAIO 2008). O N é um dos nutrientes mais absorvidos pelas plantas e de suma importância para o seu desenvolvimento, por fazer parte da estrutura da cadeia de proteínas, DNA e outros compostos orgânicos (EPSTEIN; BLOM, 2006; SANTOS, 2008; MARCHETTI; BARP, 2015).

As informações sobre o aporte de N e C em algarobais naturalmente estabelecidos no Semiárido brasileiro, assim como em outras regiões onde a

espécie ocorre (KUMAR et al, 2021), são muito escassas. Essa lacuna na literatura contrasta com a importância da espécie e seus múltiplos usos em regiões áridas e semiáridas de todo o mundo (DE MATTOS CARNEIRO et al., 2021). Uma maior compreensão dos serviços ambientais providos pelos algarobais pode contribuir para o melhor entendimento de seu papel ecológico.

Com relação ao processo de FBN, não existem estimativas, na região, das quantidades de N aportadas por essa leguminosa, dos fatores que podem regular a eficiência da simbiose e nem quais são as características das populações de rizóbios nativos que nodulam a espécie. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi gerar uma melhor compreensão na dinâmica de nitrogênio nos algarobais naturalmente estabelecidos em Pernambuco. Os objetivos específicos foram: (1) estimar as quantidades de N aportadas em algarobais por meio da simbiose com rizóbios; (2) determinar a ocorrência de rizóbios nativos que estabelecem simbiose com a espécie; e (3) determinar as relações entre a nutrição mineral e a FBN nos algarobais. As hipóteses dessa pesquisa foram: (1) Populações de *Prosopis juliflora* no semiárido pernambucano são capazes de fixar quantidades significativas de N atmosférico através da simbiose com bactérias devido à alta produtividade desses sistemas em solos com limitação de N; (2) A capacidade de FBN dos diferentes algarobais varia em função das características e diversidade das populações de bactérias presentes em cada local; e (3) A capacidade de FBN dos diferentes algarobais varia em função da disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente de fósforo e micronutrientes, em cada local;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.

O gênero *Prosopis* (Sw.) DC. está presente nas regiões mais secas das Américas, Ásia e África, sendo conhecidas mais de 50 espécies (GOVAERTS, 2018). Nas Américas, ocorre nos Estados Unidos e México e em quase todos os países da América Central e da América do Sul. A algaroba ou algarobeira pertence à família das Leguminosae, subfamília Mimosoideae (AZANI et al. 2017). Cerca de 70% das espécies do gênero são encontradas na América do Sul e dessas 93% são nativas da Argentina. No Brasil, *P. juliflora* foi introduzida no Nordeste, por volta de 1942, em Serra Talhada, Pernambuco, de sementes oriundas do Peru e, posteriormente, em Angicos, no Rio Grande do Norte, em 1946. Nas décadas de 1960 e 1970, foi amplamente propagada pelos governos nordestinos devido às suas propriedades como forrageira. Posteriormente, disseminou-se por regeneração natural (RIBASKI et al. 2009) e é considerada uma planta invasora (ANDRADE et al. 2010).

Por ser considerada uma espécie invasora, a erradicação da espécie é bastante discutida em regiões áridas e semiáridas. No entanto, um estudo que levou em consideração os aspectos econômicos, ecológicos e sociais revelou que os benefícios da invasão de *P. juliflora* são maiores que os malefícios, já que gera renda através da madeira e da produção da forragem, concluindo que o manejo sustentável e o controle da espécie pode ser uma solução melhor do que a erradicação, já que a espécie se torna um recurso natural indispensável no período de estiagem (ILUKOR et al. 2016).

Motivado pelas preocupações expressas por ecologistas sobre o aumento na extensão de *P. juliflora*, no distrito de Kachchh, em Gujarat, na Índia, Bartlett et al. (2017) realizaram um estudo utilizando métodos de refinamento de informações na mudança de uso de solo e inclusão de dados socioeconômicos, identificando objetivos estratégicos e gerando uma abordagem integrada. Concluíram que as preocupações dos ecologistas quanto a disseminação da *P. juliflora* deveriam ser minimizadas ao considerar sua importância socioeconômica para região. Isto porque a *P. juliflora* contribui como fonte de combustível, carvão, mel e goma,

proporcionando à população menos favorecida uma alternativa em sua subsistência (RIBASKI et al. 2009).

Através de relatos da população sertaneja, no Semiárido brasileiro, pode-se destacar a utilização da *P. juliflora*, principalmente como forrageira e produtora de carvão, lenha e estacas, sendo de fundamental importância na subsistência das comunidades (RODRIGUES et al. 2013). *Prosopis juliflora* encontrou um ambiente favorável para o seu desenvolvimento na Caatinga do nordeste brasileiro, devido à excelente adaptação à sazonalidade climática da região (DE CARVALHO NOGUEIRA et al 2019).

Em 2014, foram mapeados algarobais em mais de 67 mil hectares em Pernambuco, em aproximadamente 4 mil manchas distintas, localizadas principalmente em áreas de baixios e várzeas (RIEGELHAUPT, 2014). Vale ressaltar que os povoamentos de copas baixas e localizados fora dos solos aluviais não foram mapeados, já que nessas condições apresentam baixa produtividade, e o interesse do mapeamento era na capacidade de fornecimento de lenha. Neste levantamento, foi avaliado que cerca de um terço a metade das áreas de aluviões do sertão pernambucano estavam ocupados por algarobais. A presença da *P. juliflora* é maior em terras úmidas, como as aluviais, que em terras secas, já que estes ambientes são mais favoráveis ao seu desenvolvimento (ILUKOR et al. 2016; DE CARVALHO NOGUEIRA et al. 2019).

Com o propósito de contribuir para a otimização da produção de energia a partir da algarobeira, Pereira (2002) comparou as qualidades das madeiras de seis espécies de *Prosopis* plantadas em Petrolina, PE: *P. juliflora* (Sw). DC, *P. pallida* (Humb. e Bonpl. Ex Will.) Kunth, *P. velutina* Wooton, *P. glandulosa* Torr., *P. aba* Griseb. e *P. chilensis* (Mol.) Stunz. Foram determinados a densidade básica, os rendimentos da destilação seca da madeira, o poder calorífico da madeira, da casca e do carvão, os teores de carbono fixo, voláteis e cinzas do carvão, oito anos após o plantio. *P. juliflora* e *P. pallida* produziram madeira mais densa e carvão com menos cinza que as demais espécies.

Além de fonte de biomassa energética, a algarobeira possui múltiplos usos (Ribaski, 1987; Ribaski, 2000 e Ribaski et al. 2009): os frutos possuem grandes quantidades de proteína e carboidratos; a polpa doce do fruto tem 34-39% de proteína e 7-8% de óleo; a vagem é utilizada como forragem, com digestibilidade superior a 74% e as folhas, com digestibilidade de 59%. Além disso, é capaz de

formar associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, podendo ser utilizada em sistemas silvipastoris.

2.2 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um macronutriente de grande relevância para a manutenção da vida e dos ecossistemas, sendo considerado peça chave nos serviços ecossistêmicos. É um dos nutrientes mais absorvidos pelas plantas e de suma importância para o seu desenvolvimento e dos animais que as consomem, por fazer parte da estrutura da cadeia de proteínas, DNA e outros compostos orgânicos (EPSTEIN & BLOM, 2006; SANTOS, 2008). A maior parte do N no planeta terra está na atmosfera na forma de N_2 , não disponível para a absorção direta pelas plantas, devido a força com que os dois átomos de N são unidos pela tripla ligação (MELLO et al., 1989; EPSTEIN & BLOM, 2006; SANTOS, 2008). Os vegetais absorvem N do solo, principalmente nas formas disponíveis de íons NO_3^- e NH_4^+ . A disponibilidade de N no solo para as plantas, em geral, é baixa, 5% ou menos do N total, que está na sua maior parte retido em formas orgânicas (MELLO et al., 1989; EPSTEIN & BLOM, 2006; SANTOS, 2008).

Um pequeno número de microrganismos, chamados de fixadores de N ou bactérias diazotróficas, possui a enzima nitrogenase que é responsável pela quebra da ligação tripla do N_2 em N biologicamente disponível (NH_4^+). Esse processo recebe o nome de fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, estando atrás apenas da fotossíntese, sendo responsável pelo maior aporte de nitrogênio no solo (HUNGRIA et al. 2017).

Algumas espécies de bactérias fixadoras de N podem, além de colonizar abundantemente a rizosfera, ocorrer endofiticamente, ou seja, invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais. Dentre as interações entre micro-organismos fixadores de N e plantas, a simbiose de rizóbios com plantas da família Fabaceae destaca-se por sua importância ambiental, econômica e social (MOREIRA et al. 2010; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

As espécies de *Prosopis* podem estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de N atmosférico, sendo adaptadas a solos de baixa fertilidade (SCAMBATO, 2013). Os rizóbios que estabelecem simbiose com o gênero *Prosopis*, até onde se

conhece, são da ordem Rhizobiales, dentro da classe das Alphaproteobacteria. São bactérias diazotróficas, bacilos gram-negativos, que têm uma morfologia de flagelos. Pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* da família Rizobiaceae, *Bradyrhizobium*, da família Bradyrhizobiaceae, *Mesorhizobium*, da família Phyllobacteriaceae, e *Azorhizobium*, da família Hyphomicrobiaceae (SCAMBATO, 2013).

Avaliando a eficiência de isolados de rizóbios em *P. juliflora*, sendo três gêneros e 12 genótipos distintos, pertencentes a *Mesorhizobium* (8 genótipos), *Ensifer* (2 genótipos) e *Rhizobium* (2 genótipos), os mais eficientes foram os genótipos da espécie *Ensifer* (FALL et al. 2019).

Em estudo realizado com *P. juliflora* e duas espécies de acácia (*Acacia ehrenbergiana* Hayne e *Acacia tortilis* Hayne) foi encontrada maior densidade de rizóbios capazes de nodular a algaroba do que as espécies de acácia (MOSBAH et al. 2018). Em sistemas silvipastoris com *P. juliflora* de distintas idades, foi encontrada uma grande densidade de comunidades bacterianas, mais semelhantes no sistema mais antigo (12 anos) e no intermediário (8 anos) de que no sistema mais jovem (3 anos) (CUMBILLUS et al. 2016)

Apesar destes trabalhos, o conhecimento sobre as bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em simbiose com *Prosopis* spp. ainda é escasso. Em uma pesquisa na Web of Science, com as palavras “Prosopis” e “rhizobia”, foram encontrados 71 artigos sobre o tema. Esse número é baixo, principalmente considerando que desde 2009 apenas 21 trabalhos foram publicados sobre o assunto. Nenhum deles avaliou os rizóbios nativos de solos brasileiros.

Avaliando a inoculação em doze espécies de *Prosopis*, cultivadas em vermiculita com solução nutritiva isenta de N, Felker e Clark (1980) relataram que as espécies nodularam quando inoculadas e observaram a possível FBN por meio da técnica de redução do acetileno para o etileno, obtendo uma correlação positiva ente as taxas de redução de acetileno e a biomassa aérea seca produzida pelas plantas. Diagne e Baker (1999), utilizando técnicas isotópicas para quantificar a fixação biológica de nitrogênio em espécies do gênero *Prosopis* em casa de vegetação, encontraram 72,5% de nitrogênio derivado da atmosfera em *P. juliflora*, inoculada ou não, e, por extrapolação, calcularam que a quantidade de N fixado em campo poderia ser de cerca de 20 kg ha⁻¹.

2.3 Técnicas isotópicas

Isótopos são formas de um elemento químico que possuem átomos com diferentes números de nêutrons e, conseqüentemente, diferentes massas (DUCATTI et al., 2011). Alguns isótopos são radioativos, têm um núcleo instável que se desintegra emitindo radiação espontaneamente, enquanto outros, chamados de isótopos estáveis, não são objetos de decaimento e não são radioativos. Os isótopos estáveis são mais abundantes que os isótopos instáveis (CARVALHO, 2008). Vale ressaltar que grande parte dos elementos químicos possui mais de um isótopo (CARVALHO, 2008).

Os elementos C, N, S, H e O possuem mais de um isótopo, e a composição isotópica natural dos materiais pode ser quantificada, com elevada precisão, utilizando espectrômetro de massa (PETERSON; FRY, 1987; DAWSON; BROOKS, 2001). Os isótopos estáveis mais leves são mais abundantes, em muitos elementos (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S), que os isótopos mais pesados (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S) (SLEIMAN et al. 2008).

O avanço tecnológico para quantificação dos isótopos tem apresentado novas possibilidades para análises ambientais e facilitado as interpretações ecológicas, resultando em economia de esforço e recursos financeiros. Por ter dois isótopos estáveis de ocorrência natural (^{14}N e ^{15}N) e estar presente abundantemente na natureza, o N tem sido um dos elementos mais pesquisados com técnicas isotópicas (DUCATTI et al., 2011). Os métodos e técnicas baseadas na utilização do ^{15}N possibilitam uma melhor percepção da dinâmica desses nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera (UNKOVICH et al. 2001). A relação entre o isótopo mais abundante (^{14}N , em torno de 99,63%) e o isótopo menos frequente (^{15}N , em torno de 0,37%) corresponde à composição isotópica ou abundância natural do elemento (MARTINELLI et al., 2009), que pode apresentar variações, dependendo do tipo de material, não tendo, portanto, um valor constante (MARDEGAN, 2007).

Dois técnicas isotópicas são bastante utilizadas nas determinações com finalidades agrônomicas e ambientais: a abundância natural e a diluição isotópica. A diluição utiliza fertilizantes enriquecidos, com proporções de ^{15}N que variam, em geral, de 5% a 10%, e, por isso, tem alto custo financeiro, que pode ser limitante para pesquisas de grande escala (UNKOVICH et al., 2001). A técnica de abundância

natural baseia-se na comparação entre a abundância de ^{15}N de uma espécie fixadora de N, que obtém N do N_2 atmosférico em adição às fontes de N do solo, e a abundância de uma espécie referência não fixadora que obtém o seu N apenas das reservas do solo. É esperado que as plantas não fixadoras que retiram todo o seu N do solo sejam mais abundantes em ^{15}N do que as plantas fixadoras que retiram parte do N do ar, já que a maior parte dos solos é enriquecida em ^{15}N (SHEARER & KOHL, 1986). O N_2 atmosférico apresenta 99,6337% de átomos de ^{14}N e 0,3663% de átomos de ^{15}N em sua composição isotópica e é considerado o padrão para avaliação das abundâncias relativas de N, expressas em $\delta^{15}\text{N}$ (‰), sendo o $\delta^{15}\text{N}$ do N_2 atmosférico fixado com o valor 0 (JUNK; SVEC, 1958).

A composição isotópica é analisada por espectrometria de massa e expressa em unidades de “delta” ($\delta^{15}\text{N}$), que representa o desvio por mil (‰), em relação ao N_2 atmosférico da razão entre as massas de ^{15}N e ^{14}N do N contido na amostra:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) \text{ amostra} = ((\% \text{ átomo}^{15}\text{N} \text{ amostra} - 0,3663) / 0,3663) \times 1000 \text{ ou}$$

$$\delta = (\text{Ramostra} / \text{Rpadrão} - 1) \times 1000$$

onde: Ramostra e Rpadrão são as razões $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ da amostra e do padrão (N_2 atmosférico), respectivamente.

A diferença nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas tem sido bastante utilizada para calcular a fixação biológica de nitrogênio de espécies fixadoras e é calculada através da seguinte fórmula (SHEARER & KOHL, 1986):

$$\% \text{Ndda} = [(\delta^{15}\text{N}(\text{referência}) - \delta^{15}\text{N}(\text{fixadora})) / \delta^{15}\text{N}(\text{referência}) - B] \times 100$$

onde $\delta^{15}\text{N}(\text{referência})$ é o valor médio dos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas não fixadoras utilizadas como referência, $\delta^{15}\text{N}(\text{fixadora})$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ da planta fixadora e B é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N.

Na fórmula do %Ndda, o valor de B é utilizado para corrigir o fracionamento isotópico na FBN e ele corresponde ao $\delta^{15}\text{N}$ da planta fixadora cultivada em substrato isento de N, dependendo apenas do aporte do N_2 atmosférico. Os valores de B encontrados para espécies leguminosas variam na faixa de -2,0 a + 1,0 ‰ (BODDEY et al., 2000). Cada espécie tem seu valor característico de B, mas a maior

parte das leguminosas ainda não teve seu valor B determinado. Não existe valor determinado para espécies do gênero *Prosopis*. Neste caso, é recomendado usar o valor de -1,7%, encontrado para leguminosas lenhosas, segundo Kurdalling et al. (2009), Geesing et al. (2000), Yoneyama et al. (1993) e Shearer & Kohl (1986).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio em *Prosopis* spp.

Os primeiros estudos para determinação da FBN pela técnica da abundância natural em *Prosopis* foram realizados no deserto de Sonora, no sul da Califórnia (SHEARER et al. 1983). O sinal de $\delta^{15}\text{N}$ da leguminosa foi significativamente menor que $\delta^{15}\text{N}$ das plantas não leguminosas, utilizadas como referência, tornando possível a estimativa de FBN (SHEARER et al. 1983). Utilizando a determinação isotópica em região árida da Síria com plantas cultivadas em solo não salino foi encontrado $\delta^{15}\text{N}$ de -1,64 ‰, enquanto que em solo salino, o $\delta^{15}\text{N}$ foi +7,03 ‰ (KURDALI e AL-SHAMMA'A, 2009).

Experimento realizado em casa de vegetação, com plantas inoculadas ou não, utilizando a abundância natural para a estimativa de FBN, quantificou que 72,5% do nitrogênio foi derivado da atmosfera (DIAGNE e BAKER, 1999). Analisando os processos de entrada de N em florestas arenosas da Argentina, utilizando a técnica da abundância natural em *P. flexuosa*, o menor valor de $\delta^{15}\text{N}$ foliar foi -2,4 ‰, que comparado com o $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de referência (+7 ‰), indicou fixação de N atmosférico (ARANIBAR et al., 2014). Com a finalidade de quantificar a FBN em plantas de *P. glandulosa*, crescendo em sete áreas distintas do Texas, foram medidos os diâmetros basais, que variaram de 3,2 cm a 76,4 cm, verificando que em árvores mais jovens o aporte de N foi maior que em árvores velhas (GEESING et al. 2000).

Inexistem informações de fixação biológica de nitrogênio e sinais isotópicos de ^{15}N de *P. juliflora* no semiárido nordestino brasileiro, o que dificulta a quantificação do serviço ambiental de fixação biológica de nitrogênio realizado pela leguminosa e o entendimento da ciclagem biogeoquímica nos algarobais naturalmente estabelecidos.

2.5 Equações alométrica para estimativa da biomassa de *P. juliflora*

A determinação da biomassa das plantas ou de suas partes é fundamental para quantificar o N acumulado na biomassa vegetal. A partir dessa quantificação, da concentração de N na biomassa e da proporção do N derivado da atmosfera (%N_{dda}) é possível estimar a quantidade de N fixado por um indivíduo ou uma população. A biomassa de árvores pode ser determinada diretamente, por meio de amostragem destrutiva, ou pode ser estimada utilizando parâmetros dendrométricos simples, a partir da geração das equações alométricas (BIRHANE et al. 2017).

Alometria é o estudo de correlação entre a dimensão total de um organismo com as diferentes dimensões de suas partes, o que geralmente é feito usando equações para estimar o todo em função das partes ou vice-versa (GAYON, 2000). Equações alométricas têm sido utilizadas para quantificar a biomassa acima do solo a partir de medidas mais simples das árvores, como suas alturas e os diâmetros de seus caules (CHAVE et al, 2014). Estas determinações de biomassa têm adquirido cada vez mais importância com a necessidade de quantificar os estoques e fluxos de carbono no mundo, pela sua relação com as possíveis mudanças climáticas (MELO, 2017).

Para desenvolver equações alométricas e estimar biomassa acima do solo de *P. juliflora*, Birhane et al. (2017) utilizaram parâmetros dendrométricos simples: diâmetro de copa, diâmetro do caule na altura do peito e altura da árvore. Neste desenvolvimento das equações, em geral, o valor da biomassa real é obtido com a colheita destrutiva das árvores, que são tombadas e pesadas. As medidas podem ser tomadas antes ou após o tombamento, sendo as de diâmetros mais usualmente tomadas antes e as de altura após.

Na geração de equações alométricas na estimativa de madeira, biomassa seca e biomassa fresca, o modelo multiplicador de diâmetro e altura tem sido mais utilizado que o modelo de diâmetro basal, porém gera maior erro na validação, o que tem sido atribuído ao desafio da medição de altura precisa da planta quando ainda no dossel (MUTURI et al. 2012). Assim, os modelos de diâmetros têm sido melhores na validação e na geração das equações de volume e biomassa. As equações utilizam o diâmetro basal a 30 cm do solo (D30, cm) ou a altura do peito (DAP, cm), padronizada como sendo 1,3 m acima do nível do solo.

Para estimar biomassa e volume de *P. juliflora*, na floresta de Turkwell no Quênia, foram desenvolvidos por Muturi et al. (2012) modelos lineares logarítmicos usando D30. As equações foram: a) $\text{Ln}(\text{peso fresco, kg}) = 0,292D30 + 0,59$ ($R^2 = 0,94$); b) $\text{Ln}(\text{peso seco, kg}) = 0,2933D30 - 0,03$ ($R^2 = 0,92$); e c) $\text{Ln}(\text{Volume, m}^3) * (1000) = 0,3025D30 + 0,32$ ($R^2 = 0,92$). Em plantas com seis anos de idade, em Mombasa, também no Quênia, usando o diâmetro na base (D30) em equações alométricas de regressão linear simples, o volume dos caules foi $209 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ e o de galhos grossos foi $75 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ (MAGHEMBE et al. 1983).

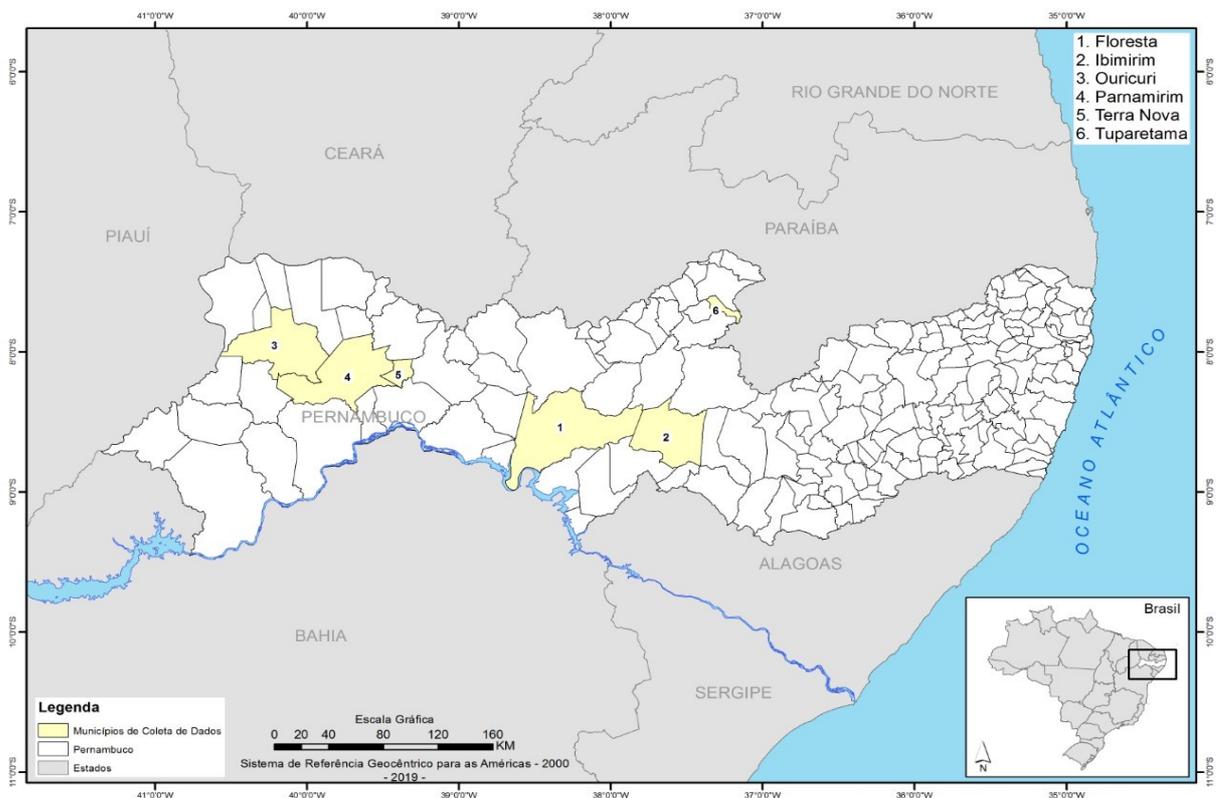
Para realizar o inventário florestal de algarobais naturalmente estabelecidos em Pernambuco foram desenvolvidas uma equação alométrica linear e outra exponencial (RIEGELHAUPT, 2014). Entretanto, foi quantificado apenas o volume de madeira com potencial energético, não tendo sido estimada a biomassa total dos algarobais, e a informação da biomassa total é necessária para quantificação do potencial do aporte de C e N nestes algarobais. Particularmente importante é a quantificação da biomassa de folhas, que, apesar de ser uma proporção pequena da biomassa aérea total, é renovada anualmente, em contraste com a biomassa de troncos e galhões, que vai se acumulando ao longo dos anos de vida das plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo em algarobais estabelecidos no semiárido pernambucano

Os algarobais presentes no estado de Pernambuco foram previamente mapeados pela Associação de Plantas do Nordeste (APNE), em 2014, em parceria do Ministério do Meio Ambiente, resultando na publicação de um livro intitulado “Manejo racional dos algarobais espontâneos para o combate a desertificação no Sertão de Pernambuco”. Na publicação foi possível determinar mais de 67 mil hectares de algarobais no Sertão de Pernambuco, estabelecidos há mais de 30 anos e sendo utilizados principalmente como lenha para a indústria local (RIEGELHAUPT, 2014). Destes algarobais do Sertão pernambucano, foram escolhidos seis, naturalmente estabelecidos, para avaliação da biomassa e da FBN (Figura 1).

Figura 1 – Mapa com localização das áreas de coleta que foram estudadas no semiárido de Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1 Descrição das áreas

3.1.1.1 Floresta

A primeira área escolhida foi no município de Floresta, na mesorregião do São Francisco. Segundo a classificação de Koppen, a área apresenta clima BSh'w, com precipitação média de 511 mm, com déficit hídrico em nove meses e temperatura média de 25°C (SOUZA, 2010). Na área, previamente mapeada pela APNE (RIEGELHAUPT, 2014), os algarobais, predominante espontâneos, crescem naturalmente em solo do tipo Luvisolo Crômico. No local específico escolhido para este estudo, as árvores são cortadas para retirada da madeira a cada oito anos. A área foi fotografada a partir de um voo de drone, em toda a extensão do algarobal, e, mais especificamente, sobre o local demarcado para o estudo (Figura 2). A coleta para realização do estudo em campo ocorreu no dia 26/08/2019.

Figura 2 - Imagens aéreas com drone de área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Floresta, Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1.2 Ibimirim

A segunda área estudada foi no município de Ibimirim, com precipitação pluviométrica de 500mm, concentrados de janeiro a abril, e temperatura média anual de 25°C. Na área previamente mapeada pela APNE (RIEGELHAUPT, 2014), os algarobais não foram cortados nos últimos 15 anos e mantêm-se como vegetação bem estabelecida com grandes troncos e galhos. O tipo de solo predominante é o Neossolo flúvico. As imagens capturadas pelo drone estão na Figura 3. A coleta para realização do estudo em campo ocorreu no dia 27/08/2019.

Figura 3 - Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Ibimirim, Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1.3 *Ouricuri*

A terceira área estudada estava no município de Ouricuri. Na área previamente mapeada pela APNE (RIEGELHAUPT, 2014), o algarobal predomina em Argissolo Vermelho-Amarelo, com precipitação pluviométrica de 660 mm. Foi cortado, segundo o proprietário da terra, para geração de renda com a venda da madeira e tem dois anos de regeneração. A imagem da área capturada pelo drone está na Figura 4. A coleta para realização do estudo em campo ocorreu no dia 13/04/2019.

Figura 4 - Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Ouricuri, Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1.4 *Parnamirim*

A quarta área estudada foi no município de Parnamirim, na estação experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O solo da área do algarobal é o Luvisolo crômico. A precipitação média anual é de 431,8mm. As árvores de algaroba não foram cortadas nos últimos 10 anos e formam uma vegetação bem densa. A imagem capturada pelo drone da área demarcada onde

foram realizadas as medições e coletas está na Figura 5. As coletas e medições em campo ocorreu no dia 14/04/2019.

Figura 5 - Imagem aérea com drone da área escolhida para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Parnamirim, Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1.5 Terra Nova

A quinta área estudada estava no município de Terra Nova. A área estudada apresenta um manejo para geração de renda com a venda da lenha e para alimentação de caprinos. A área é separada em lotes, manejados de acordo com a necessidade do proprietário. A área escolhida para avaliação (Figura 6) foi um lote que foi manejado e estava em regeneração há três anos, com tipo de solo predominante Neossolo Flúvico. As coletas e medições em campo ocorreu no dia 12/04/2019.

Figura 6 - Imagem da área para o estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Terra Nova, Pernambuco



Fonte: DANTAS (2019).

3.1.1.6 *Tuparetama*

A sexta área estudada foi o município de Tuparetama. Na área, previamente mapeada pela APNE (RIEGELHAUPT, 2014), o algarobal (Figura 7), predominante espontâneo, cresce em Neossolo flúvico. Ele foi cortado, segundo o proprietário da terra, para geração de renda com a venda da madeira e tinha em torno de cinco anos de regeneração natural, com interferência do gado nas áreas e com árvores bem espaçadas. A coleta para realização do estudo em campo ocorreu no dia 25/09/2019.

Figura 7 – Imagem aérea com drone estudo da área escolhida para estudo da estimativa de biomassa de algaroba no município de Tuparetama, Pernambuco.



Fonte: DANTAS (2019).

3.2 Estimativa da biomassa

Em cada uma das seis áreas foram estabelecidas, aleatoriamente, cinco parcelas de 20 m x 20 m. Dentro de cada parcela, todas as árvores com diâmetro de caule a altura do peito (1,3 m em relação ao solo), igual ou superior a 3 cm foram identificadas e suas circunferências medidas. Também foram medidas as circunferências basais, a 30 cm do solo, para estimativa do D30 dos indivíduos. Nas plantas com mais de uma ramificação foram medidas as circunferências de cada uma delas.

Os valores das circunferências foram transformados em diâmetro (DAP e D30) e em área basal (AB). Nos indivíduos com ramificações, foi calculada a soma das áreas basais de todas as ramificações e a partir desta soma foram calculados o DAP e o D30 equivalentes. Foi determinado o número total de indivíduos por parcelas, e o somatório das áreas basais de todos os indivíduos de cada parcela.

A biomassa total foi estimada multiplicando o valor da área basal (m^2) pela altura (m) de cada indivíduo (ABPH) e em seguida calculado o peso verde (PV, t)

utilizando a equação de Riegelhaupt et al. (2014), na qual $PV = 0,9271 \cdot (ABPH)$ ($R^2 = 0,958$). Para estimar a biomassa seca e o volume empilhado foram utilizados os fatores de conversão estimados por Riegelhaupt et al. (2014). Para estimativa da biomassa seca de folhas foram utilizadas duas formas, descritas por Silva e Sampaio (2008): a primeira considerando que a biomassa seca das folhas correspondia a 5% da biomassa aérea seca total e a segunda utilizando a equação ($0,0681 \text{ DAP}^{1,5829}$), ambas descritas para espécies arbóreas da Caatinga.

3.3 Coleta e caracterização do solo nos algarobais

Em todas as seis áreas avaliadas foram coletadas amostras compostas de solo, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, para determinação de características físicas e químicas (Tabela 1). O pH foi determinado em água (1:2,5); o P por colorimetria e com extrator de Mehlich 1; o Na^+ e o K^+ por fotometria de chama (EMBRAPA, 2009). O N total foi determinado por destilação (BREMNER e MULVANEY, 1982) e o C total via oxidação úmida (SNYDER e TROFYMOW, 1984). Os teores de areia, silte e argila foram determinados de acordo com a metodologia descrita pela EMBRAPA (2009).

Tabela 1 – Granulometria, pH, C total, N total e concentrações de P, Ca, Mg, Na, Al, K, H extraíveis, de diferentes algarobais espontâneos em áreas de municípios do sertão de Pernambuco.

		Terra Nova	Ouricuri	Parnamirim	Floresta	Ibimirim	Tuparetama
pH	(H ₂ O)	6,56 bc	6,86 abc	7,06 a	6,8 abc	6,92 ab	6,5 c
P	mg/dm ³	425 a	36 b	321 a	23 b	153 b	38 b
Ca	cmol/dm ₃	7,52 c	7,82 bc	15,15 a	11,21 b	9,75 bc	10,17 bc
Mg	cmol/dm ₃	2,59 a	1,45 a	2,04 a	3,01 a	1,88 a	2,42 a
Na	cmol/dm ₃	0,05 b	0,04 b	0,15 a	0,09 ab	0,04 b	0,18 a
K	cmol/dm ₃	0,72 b	0,66 b	0,8 ab	0,66 b	1,02 ab	1,26 a
Al	cmol/dm ₃	0	0	0	0	0	0
H	cmol/dm ₃	2,14	0,9 b	0,95 b	1,03 b	1,0 b	1,61 ab
C	g Kg ⁻¹	12,97 a	5,8 b	11,8 ab	8,99 ab	14,04 a	13,71 a
N	g Kg ⁻¹	1,3 a	0,6 b	1,3 a	0,8ab	1,39a	1,46 a
S	cmol/dm ₃	10,9 cd	9,98 d	18,1 a	15,5 ab	12,6 bcd	14,1 bc

CTC	cmol/dm ₃	13,1 cd	10,9 d	19,12 a	16,5 ab	13,7 bcd	15,64 bc
V	%	83 ab	92 ab	95,4 a	93 a	92,8 a	89,6 ab
m	%	0	0	0	0	0	0
Areia total	%	576	504	167	609	647	247
Areia Grossa	%	306	118	35	368	286	78
Areia fina	%	272	386	132	242	361	169
Silte	%	306	321	497	156	180	436
Argila	%	115	175	336	235	173	317

Médias seguidas por letras iguais nas linhas, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0.01.

3.4 Coleta e avaliação do estado nutricional das plantas nos Algarobais

Em todas as seis áreas, foram coletadas, de cada parcela, amostras de folhas saudáveis, completamente expandidas, retiradas de 10 a 20 ramos de cinco indivíduos da parcela. As amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde o material foliar foi seco em estufa de circulação forçada a 60°C por 72 horas, moído em moinho de bolas de ágata (tamanho de partículas menor que 80 µm) e homogeneizado, para determinação de macro e micronutrientes e outros elementos químicos.

Para determinação do nitrogênio total e do carbono total, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), onde foram determinados em analisador automático, acoplado ao espectrômetro de massa. O fósforo, o potássio e o sódio foram determinados no laboratório de Biomassa do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco de acordo com a metodologia descrita em EMBRAPA (2009).

3.5 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio nos Algarobais

Em todas as parcelas foram coletadas amostras compostas de folhas saudáveis, completamente expandidas, retiradas de 10 a 20 ramos de cada indivíduo da parcela. Também foram coletadas amostras de folhas de espécies não leguminosas e leguminosas sabidamente não nodulantes que serviram como plantas

de referência para estimativa do percentual do nitrogênio derivado da atmosfera (%N_{dda}).

As amostras de tecido foliar foram secas em estufa, moídas e encaminhadas ao Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), localizado na Universidade de São Paulo para determinação dos teores de C total (%), N total (%), ¹⁵N e ¹³C, por espectrometria de massa.

As abundâncias naturais do ¹⁵N e do ¹³C foram expressas em unidades de “delta” (δ¹⁵N), que representa o desvio, por mil (‰), em relação aos padrões de N (N₂ atmosférico) e de C (padrão PDB Belemnite), da razão entre as massas de ¹⁵N e ¹⁴N e de ¹³C e ¹²C:

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

Onde R_{amostra} e R_{padrão} são as razões ¹⁵N:¹⁴N da amostra e do padrão (N₂ atmosférico), respectivamente, e ¹³C:¹²C da amostra e do padrão (PDB Belemnite).

Para estimativa do percentual de nitrogênio derivado do ar (%N_{dda}) foi utilizado o método da abundância natural do ¹⁵N. Essas estimativas foram realizadas sempre que os sinais de δ¹⁵N dos algarobais foram significativamente diferentes do sinal médio das espécies referência. Para o cálculo do %N_{dda} foi utilizada a equação proposta por Shearer e Kohl (1986):

$$\%N_{\text{dda}} = [(\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - \delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}) / \delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - B] \times 100$$

Onde δ¹⁵N_(referência) é o valor médio dos δ¹⁵N das plantas referência (espécies não leguminosas ou leguminosas não nodulantes), δ¹⁵N_(fixadora) é o valor de δ¹⁵N de cada planta de algaroba e B é o valor de δ¹⁵N para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N, sendo utilizado o valor de -1,7‰ para leguminosas lenhosas (SHEARER & KOHL, 1986).

As plantas referência foram diferentes para cada localidade. Na área de Terra Nova o δ¹⁵N foi utilizado Marmeleiro (*Cydonia oblonga*), δ¹⁵N 8,67, Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) δ¹⁵N 8,67 e Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) δ¹⁵N 7,81. Na área de Ouricuri as plantas referências foram Canafistula (*Peltophorum dubium*) δ¹⁵N igual a 12,04, Juazeiro 9,96 e Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) 9,43. Em Parnamirim as plantas referências foram, Pereiro (*Aspidosperma*

pyrifolium) $\delta^{15}\text{N}$ 9,24, Nin Indiano (*Azadirachta*) $\delta^{15}\text{N}$ 11,8, Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) 8,42, Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) $\delta^{15}\text{N}$ 8,52, Quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) $\delta^{15}\text{N}$ 7,79. Em Ibimirim as plantas referências foram, Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) $\delta^{15}\text{N}$ 13,88, Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) $\delta^{15}\text{N}$ 11,52, Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) $\delta^{15}\text{N}$ 10,03 e Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) $\delta^{15}\text{N}$ 12,4. E por fim, Tuparetama as plantas referências foram, Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) $\delta^{15}\text{N}$ 9,94, Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) $\delta^{15}\text{N}$ 9,64, e Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) $\delta^{15}\text{N}$ 8,63.

A quantidade de N na biomassa foliar da algaroba, em cada uma das parcelas, foi calculada multiplicando a biomassa pelas concentrações médias de N na parcela. As quantidades de fixadas (Kg ha^{-1}) foram obtidas multiplicando as quantidades de N total das folhas pelos resultados de %N_{dda}.

3.6 Experimento de planta isca

Foi montado um experimento em casa de vegetação para determinar a ocorrência de rizóbios nativos que estabelecem simbiose com a algaroba cultivado em solos provenientes do algarobais naturalmente estabelecido. Amostras de solo foram coletadas nas áreas onde foram estabelecidas as parcelas dos municípios de Terra Nova, Ouricuri, Parnamirim, Ibimirim, Floresta e Tuparetama. As amostras foram homogeneizadas, destorroadas, passadas em peneiras de 2 mm, e colocadas em vasos de polietileno com capacidade de 500 g. O experimento consistiu em um delineamento ao acaso, com os solos de cada uma das seis áreas como tratamentos, cada solo representado por amostras compostas de cada uma das cinco parcelas e com três repetições por parcela. Sementes de algaroba foram escarificadas mecanicamente (com lixa) e desinfestadas superficialmente com etanol (70%), por três minutos, para modificação da tensão superficial, seguido de hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos e por lavagens sucessivas em água destilada estéril até retirar todo o resíduo do hipoclorito (HOAGLAND e ARNON, 1939). Foram semeadas quatro sementes por vaso, sendo feito o desbaste 15 dias após emergência (DAE), deixando apenas uma planta por vaso (Figura 8). As plantas foram regadas e a colheita, de raízes e parte aérea, foi feita 120 dias após o plantio.

Figura 8 –Desenvolvimento da algaroba cultivada em diferentes solos em casa de vegetação no DEN-UFPE.



Fonte: DANTAS (2021).

Por ocasião da coleta, as raízes foram separadas da parte aérea para melhor obtenção dos nódulos (figura 9). Os nódulos foram destacados, contados e, após o isolamento, foram secos em potes com sílica em gel, para a obtenção da sua massa seca.

Figura 9 – Variedades de nódulos de algaroba cultivado em diferentes solos em casa de vegetação.



Fonte: DANTAS (2021).

A parte aérea da planta e a parte da raiz foram secas em estufa com ventilação forçada a 65° C, para determinação das massas secas e em seguidas pesadas para determinação da biomassa seca total.

Para o isolamento dos rizóbios presentes nos nódulos foram selecionados, aleatoriamente, três nódulos por vaso. Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente com etanol comercial (98,6%), por 30 segundos, para a quebra da tensão superficial, 5 minutos de hipoclorito de sódio (5%), seguidos de dez lavagens sucessivas em água destilada estéril, a fim de remover

todo o excesso de hipoclorito. Com auxílio de uma pinça, os nódulos foram pressionados sobre placas de petri com meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA, pH 6.8) (VINCENT, 1970), com adição de corante vermelho congo (0,25% em 0,2N de KOH). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28°C e o aparecimento das colônias monitorado diariamente. Após o aparecimento das colônias, os isolados bacterianos foram transferidos para placas de petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH e incubadas na condição descrita anteriormente, por um período de 10 dias, sendo o aparecimento da colônia monitorado. Após o crescimento das colônias isoladas foi realizado a caracterização morfofisiológica dos isolados avaliando a modificação do pH do meio de cultura após o crescimento da colônia (AC: ácida; AL: alcalina, N: neutra) e as características fenotípicas:

1. Tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas aparecem até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias aparecem de quatro a seis dias; e lenta – colônias aparecem depois de seis dias);
2. pH da colônia (ácido, neutro ou básico);
3. Cor das colônias (incolor, branca, amarela, creme ou rosa);
4. Presença de muco (sim ou não);
5. Produção de muco (escasso, pouco, moderado ou abundante);
6. Consistência do muco (seca, floculosa, viscosa ou ramificada);

Após a caracterização, as colônias foram estocadas em tubos de eppendorf de 1,5 mL, contendo 1,0 mL de meio YM com glicerina (50%) para estudos posteriores.

3.7 Análise estatística

Todos os dados da caracterização química do solo, caracterização química da planta, fixação biológica de nitrogênio, sinal isotópico da *P juliflora* e das plantas referências foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando houve efeito significativo (Teste F, $p < 0,05$), foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico Assistat Beta 7.0.

No experimento de planta isca, os dados de número de nódulos, biomassa seca de raiz, biomassa seca da parte aérea, biomassa total de planta, peso de nódulo e biomassa específica de nódulo, foram submetidos a análise de variância

(ANOVA), considerando um delineamento fatorial de espécies, solos e as áreas de procedência (Terra Nova, Ouricuri, Parnamirim, Floresta, Ibimirim e Tuparetama). As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biomassas dos algarobais

No semiárido de Pernambuco foram mapeados por Riegelhaupt (2014) 3.952 povoamentos espontâneos de algaroba (*Prosopis juliflora* L.) com mais de dois hectares, espalhados pelos municípios do Sertão e do Agreste. Os seis povoamentos estudados no presente trabalho cobrem diferentes condições edafoclimáticas e foram considerados representativos das variações registradas no mapeamento de Riegelhaupt (2014). No total, foram amostrados 1806 indivíduos de *P. juliflora*, com DAP ≥ 3 cm.

Todos os seis povoamentos apresentaram-se como povoamentos exclusivos de algaroba, com atributos que variaram, possivelmente, de acordo com a idade de estabelecimento das árvores e com diferentes históricos de cortes e manejos e características edafoclimáticas. A densidade variou de 265 a 3945 indivíduos por hectare (tabela 2), com variações em altura das plantas e diâmetro do caule à altura do peito (DAP), o que afetou as estimativas de biomassas totais e de folhas. Apesar de Parnamirim apresentar uma densidade de indivíduos oito vezes maior que a de Tuparetama, essas áreas tiveram indivíduos com alturas (aproximadamente 9 metros) e áreas basais semelhantes (aproximadamente $7,7 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$), resultando em uma biomassa seca aérea em torno de 31 Mg ha^{-1} (tabela 3).

Tabela 2 - Diâmetro altura do peito, número de ramos altura, número de indivíduos por parcela, área basal no peito e indivíduos por hectares de diferentes algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.

Áreas	Diâmetro médio (cm)	Número de ramos por planta	Altura média (m)	Altura máxima (m)	Densidade (indivíduos ha^{-1})	Área Basal no Peito ($\text{m}^2 \text{ ha}^{-1}$)
Terra Nova	3,9 bc	2,05 b	4,97 bc	11,3 ab	3945 a	5,5 cd
Ouricuri	2,63 c	4,25 a	3,57 c	5,6 c	625 b	2,19 d
Parnamirim	3,68 bc	2,37 ab	5,15 bc	9,4 bc	2235 ab	7,66 bc
Floresta	7,83 a	3,65 ab	8,82 a	14,2 a	370 b	10,99 ab
Ibimirim	4,68 bc	2,9 ab	5,85 a	15,2 a	1390 b	14,46 a
Tuparetama	5,61 ab	4,4 a	5,87 b	9 bc	265 b	7,81 bc
Média	4,72	3,27	6,16	10,78	1505	8,1

CV	27,1	26,1	13,63	19,58	65,14	28,54
----	------	------	-------	-------	-------	-------

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0,01.

Tabela 3 - Biomassa aérea verde da planta, biomassa aérea seca e biomassa de folhas de diferentes algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.

Áreas	Biomassa aérea da planta		Biomassa de folhas	
	verde (Mg ha ⁻¹)	Seca (Mg ha ⁻¹)	5% da sérea seca (Mg ha ⁻¹)	Calculada por alometria (Mg ha ⁻¹)
Terra Nova	56,9 b	36,2 b	1,80 b	1,02 cd
Ouricuri	8,7 c	5,5 c	0,27 c	0,24 d
Parnamirim	50,4 bc	32,1 bc	1,60 bc	1,72 bcd
Floresta	118,7 a	75,5 a	3,77 a	3,06 ab
Ibimirim	134,4 a	85,5 a	4,27 a	4,71 a
Tuparetama	47,0 bc	29,9 bc	1,49 bc	1,95 bc
Média	69,4	44,1	2,2	2,1
CV	31,5	31,5	31,53	39,4

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0,01.

As menores alturas, tanto médias, como máximas, e áreas basais foram as dos indivíduos de Ouricuri e Terra Nova (tabela 2). Entretanto, como a densidade de indivíduos em Terra Nova (3945 ha⁻¹) foi seis vezes maior que a de Ouricuri (625 ha⁻¹), as estimativas de biomassas seca e de folhas foram muito maiores em Terra Nova (36,2 Mg ha⁻¹) que em Ouricuri (8,7 Mg ha⁻¹) (tabela 3). As maiores áreas basais e alturas foram as dos indivíduos de Floresta e Ibimirim, resultando em maiores estimativas de biomassas (75 e 85 Mg ha⁻¹, respectivamente).

O valor médio da biomassa seca da parte aérea das seis áreas estudadas foi de 44 Mg ha⁻¹, com densidade média de 1505 ind ha⁻¹ e área basal média de 8,12 m² ha⁻¹. Esse valor médio de biomassa é ligeiramente superior aos 37 Mg ha⁻¹ encontrados por Riegelhaupt (2014) em algarobais em áreas com alta densidade e áreas basais acima de 8,6 m² ha⁻¹, também no Semiárido de Pernambuco. Em ambos os casos, essas médias encobrem variações consideráveis, relacionadas a diferença de idade, altura e área basal, que são condicionadas pelas variáveis já mencionadas anteriormente. São resultados esperados por se tratar de um trabalho em campo, com povoamentos naturais, e não com cultivos com manejos e históricos

controlados, em seis áreas com condições edafoclimáticas distintas e plantas com alta diversidade genética. É interessante que ambos os valores encontrados para os algarobais naturalmente estabelecidos são superiores aos 22,45 Mg ha⁻¹ encontrados por Arif et al. (2017) em algarobal cultivado sob irrigação em Chichawatni no Paquistão, o que demonstra a adaptabilidade da espécie às condições do Semiárido brasileiro e sua capacidade de produção de biomassa, mesmo sem utilização de insumos.

Essa capacidade de produção de biomassa, que pode ser traduzida em produção de lenha, de madeira e de folhas e vagens para alimentação animal e/ou ciclagem de nutrientes, torna interessante fazer comparações com fragmentos de vegetação nativa ou cultivada de ocorrência na mesma ou outras regiões semiáridas.

A comparação com algarobais em outras regiões tem sentido por ser uma espécie adaptada a várias regiões áridas e semiáridas (ILUKOR et al. 2016), assim como a comparação com áreas da caatinga e de outras vegetações nativas. O valor médio da área basal (8,1 m² ha⁻¹) nos seis algarobais está no intervalo dos valores encontrado por Silva et al. (2017) em dois fragmentos de caatinga madura, um em Petrolina e outro em São João, com áreas basais totais de 6,08 e 10,07 m² ha⁻¹, m² ha⁻¹, respectivamente.

A biomassa da parte aérea (44 Mg ha⁻¹) foi maior que a de plantas leguminosas de florestas subsumidas e semiáridas que variaram de 17 a 31 Mg ha⁻¹ em florestas tropicais secas em todo o mundo, inclusive na Caatinga com até 25 anos de regeneração (Becknell et al. 2012; Raharimalala et al. 2012; Rozendaal et al. 2017 e Costa et al. 2021). A biomassa também foi superior à biomassa seca de caatinga madura (16,47 Mg ha⁻¹), encontrada por Silva et al. (2017), em Petrolina. Essa variação na biomassa está relacionada a densidade de indivíduos por hectare e a altura das árvores encontradas nos algarobais. A densidade média encontrada foi 1505 indivíduos ha⁻¹ nos algarobais, valor superior ao encontrado por Lima Júnior et al. (2014) em Caatinga hiperxerófila de Petrolina, com densidade média de 780 indivíduos por hectare e biomassa seca da parte aérea estimada em 10,11 Mg ha⁻¹.

A biomassa foliar variou de 0,27 a 4,27 Mg ha⁻¹, com valor médio de 2,2 Mg ha⁻¹ (tabela 3). Essa variação na quantidade de folhas de cada área pode estar relacionada com as alturas máximas e médias das plantas, uma vez que a média pode estar viesada por plantas muito grandes junto com plantas muito pequenas.

Em regiões semiáridas, outros autores encontraram biomassas foliares parecidas com às relatadas no presente estudo. Em áreas de caatinga com regeneração há 16 e 38 anos, Souza et al. (2012) encontraram biomassa de folhas de 1,8 a 3,0 Mg ha⁻¹ de leguminosas arbóreas nativas., enquanto em dois fragmentos de Caatinga as biomassas foram 1,3 Mg ha⁻¹ e 2,6 Mg ha⁻¹.

As biomassas de folhas estimadas pela equação alométrica ou considerando que correspondiam a 5% da biomassa aérea total da planta não foram muito diferentes e as médias gerais foram muito próximas. Assim, foi escolhido o percentual de folha de 5% para a estimativa de N fixado e de nutrientes acumulados na biomassa. O percentual de biomassa foliar de *P. juliflora* foi estimado em 5,6 % por Lima (1994), em algarobal em Petrolina, PE.

4.2 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio

As concentrações de nitrogênio nas folhas das algarobas foram altas em todas as áreas, como esperado para leguminosas com capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com rizóbios (McKee et al 1994) variaram entre 28,6 e 39,4 g Kg⁻¹ e embora as diferenças tenham sido pequenas, foram estatisticamente significativas (Tabela 4). Essas concentrações foram um pouco maiores que a reportada por Maghembe et al. (1983), em plantas de *P. juliflora* cultivadas no Quênia (27,6 g kg⁻¹) e estão na mesma faixa de variação de leguminosas de caatinga (SILVA et al. 2017) e em outras regiões semiáridas (SYLLA et al. 2002).

Como a faixa de variação (a maior concentração 1,4 vezes a menor) foi bem menor que a das biomassas de folhas (a maior biomassa 15 vezes a menor), as quantidades totais de N acumuladas nas folhas foram mais influenciadas pelas biomassas, variando de 11 (Ouricuri) a 139 kg ha⁻¹ (Ibimirim).

Tabela 4 - Concentração de N, quantidade de N, $\delta^{15}\text{N}$ de algaroba, $\delta^{15}\text{N}$ médio de plantas referências, Nitrogênio derivado da atmosfera (%) e N fixado (kg ha^{-1}) das diferentes áreas de algarobais espontâneos no sertão de Pernambuco.

Áreas	N (g Kg^{-1})	N Acumulado (Kg ha^{-1})	Algaroba $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Plantas referências $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndda (%)	N fixado (kg ha^{-1})
Terra Nova	28,6 c	51,1 b	5,71± 1,24 **	8,1	24,42 c	13,2 bc
Ouricuri	39,5 a	10,8 b	5,15±1,61 **	10,43	43,47 b	5,0 c
Parnamirim	29,6 c	47,4 b	4,78±2,48 **	12,17	41,25 bc	19,8 bc
Floresta	35,0 b	132,7 a	10,53±1,81 ns	8,4	0	0
Ibimirim	32,6 b	138,72 a	6,69±1,52 **	12,17	46,71 b	66,2 a
Tuparetam a	37,6 a	56,72 b	1,48 ± 1,06**	9,41	71,32 a	38,9 ab
CV (%)	9,07	32,3	32,92		20,01	50,52

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0.01.

Os sinais de $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para as algarobas, estimado pelo sinal isotópico das espécies referência, variaram entre 8,1 – 12,2‰ nas seis áreas (Tabela 4). São valores dentro da faixa típica de valores encontrados em áreas de Caatinga (Freitas et al. 2015). Esses valores altos, demonstram a predominância de processos de perdas de N que tendem a enriquecer isotopicamente os sistemas, ou seja, são sistemas com ciclos de N abertos, principalmente os de Ibimirim e de Parnamirim. Vários autores já demonstraram que ciclos abertos são mais típicos de regiões com climas que apresentam menores pluviosidades. Por conta dessas características, esses locais apresentam condições que geralmente facilitam estimativas mais precisas da proporção de N derivado da atmosfera em espécies arbóreas (FREITAS et al. 2015), aumentando a precisão da técnica da abundância natural do ^{15}N .

Além das características de serem ambientes naturalmente enriquecidos isotopicamente, em todos os algarobais foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre a média dos sinais isotópicos das plantas referência e a média dos sinais das algarobas, com exceção das plantas do algarobal de Floresta (Tabela 3). Neste fragmento, considerou-se que as algarobas não apresentaram

absorção de N atmosférico, pelo menos no ciclo de crescimento e produção de folhas considerado na pesquisa. Com exceção de Terra Nova, em que a algaroba apresentou sinal de ^{15}N 2,39 unidades de δ menor que o sinal das plantas referências, nos demais locais, as diferenças variaram entre 5,28 e 7,93 unidades de delta, o que resultou em estimativas altas e pouco dependentes do valor B do percentual de N derivado da atmosfera (%N_{dda}).

A ausência de fixação em leguminosas pode estar relacionada à baixa disponibilidade de fósforo no solo, (AERTS e CHAPIN III 1999; GÜSEWELL 2004; REICH e OLEKSYN 2004), tornando-o limitante à FBN (SILVA et al. 2017). Essa limitação de P foi observada por Baldarelli et al. (2021) em *Prosopis glandulosa* Torr. crescendo do deserto de Chihuahua, no México. Eles ressaltaram a importância da conectividade dos ciclos de N e P para a fixação biológica de nitrogênio. Entretanto, esse não aparenta ser o caso das algarobas de Floresta, que apresentam uma relação N/P adequada em seu tecido foliar (tabela 5), que não é indicadora de que o P é um nutriente limitante em relação ao N.

O percentual de nitrogênio derivado da atmosfera variou de 24,4 % em Terra Nova a 71,1% em Tuparetama. A FBN em *P. juliflora*, relatada por Diagne e Baker (1999), contribuiu com 72,5% de nitrogênio derivado da atmosfera e, por extrapolação, eles calcularam que a quantidade de N fixado foi cerca de 20 kg ha⁻¹. Villagra e Felker (1997) também encontraram alto percentual de fixação N em *P. glandulosa*, variando de 63% a 73%, em sete áreas distintas do Texas.

Na caatinga, altas capacidades de fixação biológica de nitrogênio de leguminosas nativas também têm sido relatadas (FREITAS et al., 2010; SOUZA et al., 2012, SILVA et al 2017). Freitas et al. (2010), em Santa Teresinha, PB, Serra Talhada, PE e Remígio, PB encontraram proporções de N_{dda} de 28%, 58% e 54 %, respectivamente. Já no trabalho de Souza et al. (2012) a proporção foi maior que 60% em área com caatinga madura e foi 40 e 71% em *M. tenuiflora* em área de regeneração e Caatinga madura, respectivamente (Silva 2017). Entretanto, a ausência de fixação em espécies que são potencialmente fixadoras, já foi relatada por Souza et al. (2012) e por Martins et al. (2015), sob condições semiáridas do Nordeste Brasileiro.

A maior quantidade de N fixado foi 66,2 kg ha⁻¹ em Ibimirim. Esse maior aporte ocorreu devido à maior biomassa de folhas dessa localidade. Esse valor foi cerca de dez vezes superior ao encontrado por Souza et al. (2012), em áreas de

Caatinga com diferentes períodos de regeneração no Sertão paraibano (aproximadamente $6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$). Freitas et al. (2010) encontraram uma contribuição da FBN de $11 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e Silva (2017) de $18 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em áreas de caatinga madura em São João. O percentual de N_{dda} encontrado por Sylla et al. (2002), no semiárido do Senegal, variou de 26% a 49% e a quantidade de N fixado em *Pterocarpus lucens* variou de 10,8 a $28,9 \text{ kg ha}^{-1}$.

A quantidade média fixada de $28,6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, nas cinco áreas estudadas nos algarobais espontâneos de Pernambuco, foi superior à quantidade de N aportado pela FBN na caatinga ((FREITAS et al., 2010; SOUZA et al., 2012, SILVA et al 2017) e também mais alta do que as de outras florestas tropicais, como relatado por Roggy et al. (1999) que estimaram $7 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em leguminosas em floresta natural na Guiana e Nardoto et al. (2014) que estimaram a taxa média de fixação simbiótica da floresta amazônica em $3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

Admitindo que a amostragem foi representativa das variações de ambiente e de idades de regeneração em Pernambuco, a quantidade média fixada ($28,6 \text{ kg ha}^{-1}$) pode ser extrapolada para os 67 mil hectares de algarobais no estado (RIEGELHAUPT, 2014). Embora seja uma estimativa relativamente grosseira, os cerca de 2 Gg de N fixados nas folhas dão uma ideia da dimensão da contribuição dos algarobais para o enriquecimento dos solos nas áreas de várzeas do estado. Aumentando essa extrapolação para os 113 mil hectares de algarobais espontâneos presentes na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (BRASIL, 2018) essa estimativa sobe para 3,2 Gg de N fixado nas folhas dos algarobais.

4.3 Concentração de nutrientes nas amostras de folhas dos algarobais

Em todas as áreas, a relação C/N foi inferior a 14 (tabela 5). Em estudo realizado por Menezes et al. (2002) a relação C/N de 17 da *Prosopis juliflora*, favoreceu a mineralização de nitrogênio no sistema silvipastoril no Semiárido paraibano. Alves et al (2011) observaram que materiais como as folhas de *Mimosa tenuiflora*, *Prosopis juliflora*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena ssp* e *Atriplex spp* poderiam ser incorporados diretamente ao solo visto que apresentaram rápida mineralização de N devido à baixa relação C/N. Na *Prosopis juliflora* a relação foi de 13 com 1,48% de N mineralizado em 28 dias de decomposição.

Tabela 5 - Concentrações de C, N, P, K, Na, Ca, relação C/N e relação N/P nas folhas de diferentes algarobais espontâneos no Sertão de Pernambuco.

Áreas	C (g Kg ⁻¹)	N (g Kg ⁻¹)	P (g Kg ⁻¹)	Na (g Kg ⁻¹)	K (g Kg ⁻¹)	Ca (g Kg ⁻¹)	C/N	C/P	N/P
Terra Nova	425,3 c	28,62 c	0,29 d	1,77 a	8,87 d	15,18 a	14,96 a	1518 a	102 a
Ouricuri	440,9 b	39,46 a	0,91 c	1,80 a	23,85 a	2,87 c	11,2 c	490 b	43 b
Parnamirim	414,3 cd	29,58 c	0,79 c	0,91 b	8,75 d	16,62 a	14,2 a	524 b	37 bc
Floresta	414,1 cd	35,0 b	1,62 b	1,05 b	17,38 b	7,34 b	11,8 bc	259 b	21 c
Ibimirim	399,3 d	32,6 b	1,84 a	0,62 b	17,80 b	13,56 a	12,4 b	218 b	17 c
Tuparetama	456,4 a	37,6 a	1,77 ab	0,82 b	13,7 c	7,87 b	12,1 b	258 b	21 c
CV (%)	4,35	9,07	19,45	74,9	27,4	46,2	8,74	30,3	26,7

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0.01.

A relação N/P foi maior nas áreas de Ouricuri e Terra Nova (102 e 43, respectivamente) que em Floresta, Ibimirim e Tuparetama, que variaram de 17 a 21. Plantas que apresentam relações N:P >16 sofrem limitação por P (Koerselman e Meuleman 1996; Gusewell 2004; Han et al. 2005). Portanto, podem ter sido um fator limitante para a fixação biológica de nitrogênio nas áreas de Floresta, Ibimirim e Tuparetama. Entretanto, a relação da FBN e a razão N:P é complexa, pois a simbiose confere uma vantagem na aquisição de P pelas plantas (Houlton et al. 2008); possivelmente porque as plantas fixadoras poderiam investir na produção de N fosfatases (Wang et al. 2007), com concentrações foliares de P altas. Essas concentrações de P foliar são semelhantes às encontradas por Zhour et al, (2018) com relação N:P de 24,83 e relação C:N de aproximadamente 15 em folhas de *Prosopis glandulosa*.

A área de Ouricuri destacou-se nas concentrações de nitrogênio (39,46 g Kg⁻¹), potássio (23,85 g Kg⁻¹) e sódio (1,80 g Kg⁻¹), no tecido foliar, significativamente superiores às das demais áreas. Esses resultados foram parecidos com os valores reportado por Maghembe et al. (1983) que encontraram concentrações de N de 27,6 g Kg⁻¹ e de K de 24,2 g Kg⁻¹), na biomassa foliar de *P. juliflora*.

4.4 Experimento planta isca

Desenvolvimento das espécies de Algaroba e observação da nodulação natural

A algaroba cultivada em casa de vegetação nodulou abundantemente em todos os solos, mesmo que não tenha sido inoculada com rizóbios. Logo, a simbiose foi estabelecida com as populações de bactérias nativas. Freitas et al. (2011) observaram nodulação abundante em leguminosas não inoculadas em solos do Semiárido nordestino, mas não incluíram a algaroba, trabalhando apenas com as nativas.

O maior número de nódulos por planta foi obtido no cultivo no solo proveniente do município de Parnamirim, embora só tenha sido significativamente superior ao número de nódulos por planta no solo proveniente do município de Floresta (Tabela 6). O baixo número de nódulos no solo de Floresta pode estar relacionado à menor disponibilidade de fósforo disponível no solo deste local. Silva et al. (2017) relataram que a baixa eficiência de simbiose e ausência de fixação estão relacionadas à ausência de populações de rizóbios ou à baixa disponibilidade de P. Já o peso seco de nódulos não diferiu significativamente entre os solos.

As biomassas totais das plantas e das raízes foram maiores no cultivo no solo coletado em Ibimirim que no coletado em Ouricuri, não diferindo significativamente dos demais solos. A biomassa aérea também foi menor no solo de Ouricuri, que foi inferior às de Parnamirim, Ibimirim e Tuparetama (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de nódulos, peso seco de nódulos, peso seco de raiz, peso seco da parte aérea e biomassa total de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.

Local	Biomassa			Nódulos		
	Total	Aérea	Raízes	Massa	Número	Específica
	----- g planta ⁻¹ -----			----- mg planta ⁻¹		----- mg nódulo ⁻¹
Terra Nova	3,25 cd	2,34 ab	0,90 bc	78	29	3
Ouricuri	2,67 d	1,86 b	0,81 c	86	30	3
Parnamirim	4,17 abc	3,16 a	1,01 bc	80	36	2
Floresta	3,39 bcd	2,12 b	1,26 bc	150	14	11
Ibimirim	4,88 a	3,06 a	1,81 a	170	18	9
Tuparetama	4,49 ab	3,20 a	1,29 b	110	26	4
CV	32,5	35,6	41,8			

Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de probabilidade de 0.01.

A algaroba cultivada em casa de vegetação com os seis tipos de solos provenientes dos municípios de Terra Nova, Ouricuri, Parnamirim, Floresta, Ibimirim e Tuparetama foram capazes de formar uma relação simbiótica, resultando na interação solo-planta, conforme as figuras 10, 11 e 12, onde é apresentado maior número de nódulos na algaroba cultivada no município de Parnamirim e maior produção de biomassa aérea e biomassa de raiz na algaroba cultivada no município de Ibimirim.

O menor número de nódulos foi na algaroba cultivada no solo de Floresta, onde o mesmo apresentou uma menor disponibilidade de fósforo disponível para planta. Silva et al, (2017) relatam que a baixa eficiência de simbiose e ausência de fixação, está relacionada à ausência de populações de rizóbios, ou baixa disponibilidade de P.

Figura 10 – Análise da Biomassa seca da raiz x Biomassa seca da parte aérea de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.

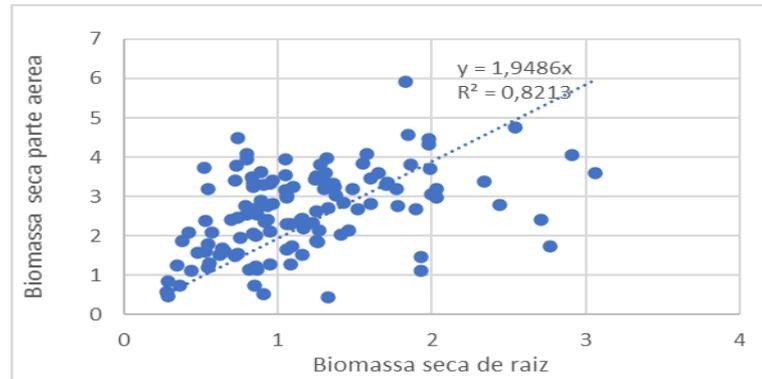


Figura 11 – Análise da Biomassa seca total da planta x nº de nódulos de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.

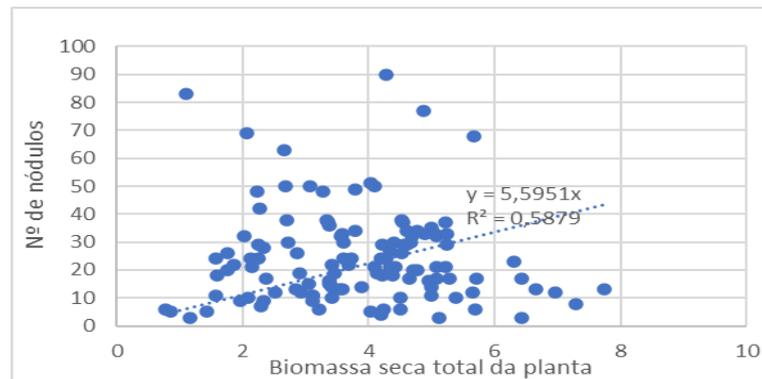
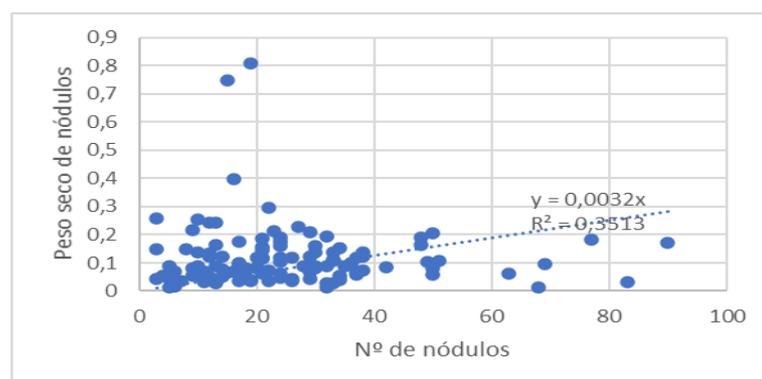


Figura 12 – Nº de nódulos x Peso seco de nódulos de algaroba cultivada em diferentes solos de algarobais espontâneos em casa de vegetação.



CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS BACTÉRIAS DE NÓDULOS

Foram obtidos 270 isolados a partir dos nódulos da algaroba cultivada em casa de vegetação nos solos das seis áreas. Todas as colônias foram de crescimento rápido e apresentaram cores normalmente associadas a rizóbios, variando entre creme e amarelo. Com base da alteração do pH, 72% delas foram produtoras de ácido em meio de cultura e 28% não alteraram o pH do meio YMA (Tabela 7). Em experimento realizado em casa de vegetação por Fterich (2011) para caracterização fenotípica de 50 isolados bacterianos de nódulos de raízes de *Prosopis farcta* cultivadas em solos áridos da Tunísia, todos os isolados apresentaram característica de rápido crescimento e a maioria desenvolveu-se em pH ácido e neutro.

Tabela 7 - Caracterização fenotípicas das bactérias de nódulos de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.

	Total de isolados	Tempo de crescimento			pH do meio			Cor da colônia				
		rápida até 72h	intermediária (3 a 5)	lenta (<5)	Ácido	Neutro	Alc.	Incolor	Branca	Amarela	Creme	Rósea
Terra Nova	45	45	0	0	27	18	0	0	0	3	42	0
Ouricuri	45	45	0	0	39	6	0	0	0	6	39	0
Parnamirim	45	45	0	0	30	15	0	0	0	0	45	0
Floresta	45	45	0	0	30	15	0	0	0	0	45	0
Ibimirim	45	45	0	0	42	3	0	0	0	6	39	0
Tuparetama	45	45	0	0	27	18	0	0	0	6	39	0
Total	270	270	0	0	195	75	0	0	0	21	249	0

Nos 270 isolados foi produzido muco (tabela 8), com 70% de produção abundante, 23% de produção moderada e 7% de pouca produção. A consistência do muco variou de viscosa (42%), a seca (39%) e floculosa (19%). Essas características são evidenciadas de maneira comum para microssimbiontes de diferentes espécies de leguminosas em solos de região semiárida (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014).

Tabela 8 – Presença de muco nos isolados das bactérias de nódulos de algaroba cultivada em casa de vegetação com solos de diferentes localidades do sertão de Pernambuco.

	Presença de muco		Produção de muco				consistência do muco			
	S	N	Escasso	Pouco	Moderado	Abundante	Seca	floculosa	Viscosa	Ramificada
Terra Nova	45	0	0	6	12	27	15	9	21	0
Ouricuri	45	0	0	0	12	33	9	15	21	0
Parnamirim	45	0	0	0	9	36	21	6	18	0
Floresta	45	0	0	12	9	24	27	6	12	0
Ibimirim	45	0	0	0	15	30	33	9	3	0
Tuparetama	45	0	0	0	6	39	0	6	39	0
Total	270	0	0	18	63	189	105	51	114	0

5 CONCLUSÃO

Foi possível estimar a fixação biológica de nitrogênio em cinco das áreas (Ibimirim, Tuparetama, Terra Nova e Ouricuri e Parnamirim) mas não em Floresta, onde as plantas parecem não estar fixando. A ausência da FBN em Floresta não pode ser explicada pela ausência de rizóbios ou pela limitação de P em que apresentam uma relação N/P adequada em seu tecido foliar

As proporções de N fixado nas folhas variaram de 24 a 71%, sendo maior em Tuparetama. As quantidades fixadas nas folhas variaram de 5 a 66 kg ha⁻¹, sendo maior em Ibimirim, devido à maior biomassa foliar.

No experimento de casa de vegetação, as plantas cultivadas em todos os solos estabeleceram simbiose com a algaroba cultivada como planta isca, indicando a ocorrência de rizóbios nativos. Onde foram obtidos 270 isolados a partir dos nódulos de Algaroba, todos de crescimento rápido, com cores variando entre creme e amarelo, foi possível observar a presença de muco, com 70% de produção abundante, 23% de produção moderada e 7% de pouca produção de muco. A consistência do muco variou de viscosa com 42%, 39% seca e 19% floculosa.

REFERÊNCIAS

- AERTS, RIEN; CHAPIN III, F. STUART. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in ecological research*, v. 30, p. 1-67, 1999.
- ALVES, R. N., MENEZES, R. S., SALCEDO, I. H., & PEREIRA, W. E. Relação entre qualidade e liberação de N por plantas do semiárido usadas como adubo verde. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, p. 1107-1114, 2011.
- ANDRADE, L. A.; FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, F.X. Impactos da invasão de *Prosopis juliflora* (sw.) DC.(Fabaceae) sobre o estrato arbustivo-arbóreo em áreas de Caatinga no Estado da Paraíba, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 32, n. 3, p. 249-255, 2010.
- ARANIBAR, J. N., GOIRÁN, S. B., GUEVARA, A., & VILLAGRA, P. E. Carbon and nitrogen dynamics in a sandy groundwater-coupled ecosystem in the Monte Desert, indicated by plant stable isotopes. *Journal of Arid Environments*, v. 102, p. 58-67, 2014.
- ARAÚJO FILHO, J. C.; BURGOS, N.; LOPES, O. F.; SILVA, F. H. B. B.; MEDEIROS, L. A. R.; MELO FILHO, H. F. R.; PARAHYBA, R. B. V.; CAVALCANTI, A. C.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SILVA, F. B. R.; LEITE, A. P.; SANTOS, J. C. P.; SOUSA NETO, N. C.; SILVA, A. B.; LUZ, L. R. Q. P.; LIMA, P. C.; REIS, R. M. G.; BARROS, A. H. C. Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco. *Boletim de Pesquisa Embrapa Solos*, n. 11, 2000.
- ARIF, M., SHAHZAD, M. K., ELZAKI, E. E. A., HUSSAIN, A., ZHANG, B., & YUKUN, C. Biomass and carbon stocks estimation in Chichawatni irrigated plantation in Pakistan. *Internacional Jornal of Agriculture and biology*, v. 19, p. 1339-1349, 2017.
- AZANI, N., BABINEAU, M., BAILEY, C. D., BANKS, H., BARBOSA, A. R., PINTO, R. B., ... & ZIMMERMAN, E. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxonomy*, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- BALDARELLI, L. M., COLLINS, S. L., & WARD, D. How encroaching shrubs and nutrients affect N₂-fixation in the Chihuahuan desert. *Plant and Soil*, v. 466, n. 1, p. 545-556, 2021.
- BARTLETT, D., GOMEZ-MARTIN, E., MILLIKEN, S., & PARMER, D. Introducing landscape character assessment and the ecosystem service approach to India: A case study. *Landscape and Urban Planning*, v. 167, p. 257-266, 2017.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Biomassa para energia no Nordeste: atualidades e perspectivas [resumo eletrônico] / Ministério do Meio Ambiente, Programa das Nações unidas para o Desenvolvimento – Brasília, DF: MMA, 2018.

BECKNELL, J. M., & POWERS, J. S. Stand age and soils as drivers of plant functional traits and aboveground biomass in secondary tropical dry forest. *Canadian Journal of Forest Research*, v. 44, n. 6, p. 604-613, 2014.

BREMNER, J.M. & MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L., ed. *Methods of soil analysis, part 2*. 2.ed. Madison, Soil Science Society of America, 1982. P.595-624.

BIRHANE, E., TREYDTE, A. C., ESHETE, A., SOLOMON, N., & HAILEMARIAM, M. Can rangelands gain from bush encroachment? Carbon stocks of communal grazing lands invaded by *Prosopis juliflora*. *Journal of Arid Environments*, v. 141, p. 60-67, 2017.

CABRAL, G.A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B. & ALMEIDA CORTEZ, J.S. Estrutura espacial e biomassa da parte aérea em diferentes estádios sucessionais de caatinga, em Santa Terezinha, Paraíba. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v.6, n.3, p.566-574, 2013.

CHAVE, J., RÉJOU-MÉCHAIN, M., BÚRQUEZ, A., CHIDUMAYO, E., COLGAN, M. S., DELITTI, W. B., HENRY, M. Improved allometric models to estimate the aboveground biomass of tropical trees. *Global Change Biology*, v. 20, n. 10, p. 3177-3190, 2014.

CARVALHO, M.C. Uso dos isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre em estudos de ecologia costeira, *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.4, p.694-705, 2008.

CRAMER, M. D., CHIMPHANGO, S. B., VAN CAUTER, A., WALDRAM, M. S., & BOND, W. J. Grass competition induces N₂ fixation in some species of African *Acacia*. *Journal of Ecology*, v. 95, n. 5, p. 1123-1133, 2007.

COSTA, T. L., SAMPAIO, E. V., ARAÚJO, E. L., SILVA, A. F., & FREITAS, A. D. Contributions of Leguminosae to young and old stands of neotropical forests under different environmental conditions. *Annals of Forest Science*, v. 78, n. 2, p. 1-21, 2021.

CORREIA, K. G., DE ARAÚJO FILHO, R. N., MENEZES, R. S. C., SOUTO, J. S., & FERNANDES, P. D. Atividade microbiana e matéria orgânica leve em áreas de caatinga de diferentes estágios sucessionais no semiárido paraibano. *Revista Caatinga*, v. 28, n. 1, p. 196-202, 2015.

CUBILLOS, A. M., VALLEJO, V. E., ARBELI, Z., TERÁN, W., DICK, R. P., MOLINA, C. H., ... & ROLDAN, F. Effect of the conversion of conventional pasture to intensive silvopastoral systems on edaphic bacterial and ammonia oxidizer communities in Colombia. *European journal of soil biology*, v. 72, p. 42-50, 2016.

DAWSON, T. E.; BROOKS, P. D. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: Unkovich M. et al. (Ed.). *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. cap. I, p. 1-18.

DE CARVALHO NOGUEIRA, F., PAGOTTO, M. A., ARAGÃO, J. R. V., ROIG, F. A., DE SOUZA RIBEIRO, A., & LISI, C. S. The hydrological performance of *Prosopis juliflora* (Sw.) growth as an invasive alien tree species in the semiarid tropics of northeastern Brazil. *Biological Invasions*, v. 21, n. 8, p. 2561-2575, 2019.

DE MATTOS CARNEIRO-JUNIOR, J. A., DE OLIVEIRA, G. F., ALVES, C. T., ANDRADE, H. M. C., DE MELO, S. A. B. V., & TORRES, E. A. Valorization of *Prosopis juliflora* Woody Biomass in Northeast Brazilian through Dry Torrefaction. *Energies*, v. 14, n. 12, p. 3465, 2021.

DIAGNE, OUSMAN; BAKER, DWIGHT D. Quantification of symbiotic N fixation by *Prosopis juliflora* (swartz) DC using ¹⁵N-isotope dilution methodology. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, n. 12, p. 1709-1710, 1994.

DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.B.; MARTINS, M.B.; VIEIRA JÚNIOR, L.C. & DENADAI, J.C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.68-75, 2011.

EPSTEIN, E.; BLOON, J. *Nutrição mineral de plantas*. 2 ed. Londrina: Editora Plana. 401p. 2006.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2009. 627p.

FALL, F., LE ROUX, C., BÂ, A. M., FALL, D., BAKHOUM, N., FAYE, M. N. & DIOUF, D. The rhizosphere of the halophytic grass *Sporobolus robustus* Kunth hosts rhizobium genospecies that are efficient on *Prosopis juliflora* (Sw.) DC and *Vachellia seyal* (Del.) PJH Hurter seedlings. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 232-239, 2019.

FELKER, P., & CLARK, P. R. (1980). Nitrogen fixation (acetylene reduction) and cross inoculation in 12 *Prosopis* (mesquite) species. *Plant and Soil*, 57(2-3), 177-186.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; BARBOZA, J. A. C.; MARTINS, L. M. V. Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).

FERNANDEZ, Z. H.; SANTOS JÚNIOR, J. A.; AMARAL, R. S.; ALVAREZ, J. R. E.; SILVA, E. B.; FRANÇA, E. J.; MENEZES, R. S. C.; FARIAS, E. E. G.; SANTOS, J. M. N. EDXRF as an alternative method for multielement analysis of tropical soils and sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.189, p. 447, 2017.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B. Fixação biológica do N₂ em leguminosas arbóreas da Paraíba e de Pernambuco. In: MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S.

B.; SALCEDO, I. H. Fertilidade do solo e produção de biomassa no semiárido. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2008. p. 27-46.

FREITAS ADS, SAMPAIO EVSB, SANTOS CERS, FERNANDES AR Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. *Journal of Arid Environments*, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010.

FREITAS, A.D.S.; BORGES, W.L.; ANDRADE, M.M.M.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; MULATO, B.M. & LYRA, M.C.C.P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. *African Journal of Microbiology Research*, v.8, n.8, p.788-796, 2014.

FREITAS, A. D. S., SAMPAIO, E. V. D. S. B., DE SOUZA RAMOS, A. P., DE VASCONCELLOS BARBOSA, M. R., LYRA, R. P., & ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1, p. 109-122, 2015.

FTERICH, A., MAHDHI, M., CAVIEDES, M. A., PAJUELO, E., RIVAS, R., RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D., & MARS, M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Archives of microbiology*, v. 193, n. 6, p. 385-397, 2011.

GAYON, J. History of the concept of allometry. *American zoologist*, v. 40, n. 5, p. 748-758, 2000.

GEESING, D., FELKER, P., & BINGHAM, R. L. Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: Implications for global carbon sequestration. *Journal of Arid Environments*, v. 46, n. 2, p. 157-180, 2000.

GOVAERTS, R. H. 101 Nomenclatural corrections in preparation for the Plants of the World Online (POWO). *Skvortsovia*, v. 4, n. 3, p. 74-99, 2018.

GÜSEWELL, S., N: P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist*, v. 164, n. 2, p. 243-266, 2004.

HAN, W., FANG, J., GUO, D., & ZHANG, Y. Leaf nitrogen and phosphorus stoichiometry across 753 terrestrial plant species in China. *New phytologist*, v. 168, n. 2, p. 377-385, 2005.

HOAGLAND DR, ARNON DI.; The water culture method growing plants without soil. U Calif Agric Exp Sta, California, 1939.

HÖGBERG, P.; ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, v.137, p. 179-203, 1997.

HÖGBERG P, NÄSHOLM T, HÖGBOM L, STAHL L (1994) Use of ¹⁵N labelling and ¹⁵N natural abundance to quantify the role of mycorrhizas in N uptake by plants:

importance of seed N and of changes in the ^{15}N labelling of the available N. *New Phytologist* 127:515–519.

HOULTON B. Z., WANG Y. Y. VITOUSEK P. M., FIELD C. B. A. unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, v. 454, n. 7202, p. 327-330, 2008.

HUNGRIA, M., ARAUJO, R. S., JÚNIOR, S., BARBOSA, E., & ZILLI, J. É. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. *Agronomy Journal*, v. 109, n. 3, p. 1106-1112, 2017.

ILLAGRA, G. M. L., & FELKER, P. Influence of understory removal, thinning and P fertilization on N_2 fixation in a mature mesquite (*Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*) stand. *Journal of Arid Environments*, v. 36, n. 4, p. 591-610, 1997.

ILUKOR, J., RETTBERG, S., TREYDTE, A., & BIRNER, R. To eradicate or not to eradicate? Recommendations on *Prosopis juliflora* management in Afar, Ethiopia, from an interdisciplinary perspective. *Pastoralism*, v. 6, n. 1, p. 14, 2016.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Oxford, v. 14, p. 234-243, 1958.

KOERSELMAN, W., & MEULEMAN, A. F. The vegetation N: P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of applied Ecology*, p. 1441-1450, 1996.

KUMAR, P., MISHRA, A. K., CHAUDHARI, S. K., SINGH, R., PANDEY, C. B., YADAV, R. K., & SHARMA, D. K. Different *Prosopis* species influence sodic soil ecology by favouring carbon build-up and reclamation in North-West India. *Tropical Ecology*, v. 62, n. 1, p. 71-81, 2021.

KURDALI, F.; AL-SHAMMA'A, M. Natural abundances of ^{15}N and ^{13}C in leaves of some N_2 -fixing and non- N_2 -fixing trees and shrubs in Syria. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2009.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, London, v. 147, p. 981-93, 2001. Disponível em: <doi:10.1099/00221287-147-4-981>.

LIMA, P. Manejo de áreas individuais de algaroba: relatório final. Embrapa Semiárido-Outras publicações científicas (ALICE), 2005.

LIMA JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L.J.O.; GIONGO, V.; LIMA, R.L.F.A.; SAMPAIO, E.V.S.B. & MENEZES, R.S.C. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. *Cientia Forestalis*, v.42, n.102, p.289-298, 2014.

LÓPEZ-BELLIDO, F. J., LÓPEZ-BELLIDO, R. J., REDONDO, R., & LÓPEZ-BELLIDO, L. B value and isotopic fractionation in N₂ fixation by chickpea (*Cicer arietinum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil*, 337(1-2), 425-434, 2010.

MAGHEMBE, J. A., KARIUKI, E. M., & HALLER, R. D. Rene D. Biomass and nutrient accumulation in young *Prosopis juliflora* at Mombasa, Kenya. *Agroforestry Systems*, v. 1, n. 4, p. 313-321, 1983.

MARCHETTI, M. M., & BARP, E. A. Efeito rizosfera: a importância de bactérias fixadoras de nitrogênio para o solo/planta–revisão. *Ignis: Periódico Científico de Arquitetura e Urbanismo, Engenharias e Tecnologia da Informação*, p. 61-71, 2015.

MARDEGAN, S.F. Abundância natural de ¹⁵N em solos e folhas de áreas de campina e campinarana da Reserva Biológica da Campina – INPA, região de Manaus, Amazonas. Manaus: UFAM, 2007. 89p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2007.

MARTINELLI, L.A.; OMETTO, J.P.H.B.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B. & MOREIRA, M.Z. Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis. São Paulo: Ed. Oficina de textos, 2009. 144p

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A.D.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E. V. S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricídia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, p. 178-184, 2015.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Londres, v. 58, p. 200–214, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijms.0.65392-0>>.

McKey, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. *The nitrogen factor*, p. 221-228, 1994.

MELO, A. W. F. D. Alometria de árvores e biomassa florestal na Amazônia Sul-Occidental. 2017.

MELLO, F.A.F.; SOBRINHO, M.O.C.B.; ARZOLLA, R.I.; SILVEIRA, R.I.; NETTO, A.C.; KIEHL, J.C. Fertilidade do solo. *Nobel*, p.139-175, 1989.

MENEZES, R. S. C., SALCEDO, I. H., & ELLIOTT, E. T. Microclimate and nutrient dynamics in a silvopastoral system of semiarid northeastern Brazil. *Agroforestry systems*, v. 56, n. 1, p. 27-38, 2002.

MOSBAH, MAHDHI; TAIEB, TOUNEKTI; HABIB, KHEMIRA. Invasive Character of *Prosopis juliflora* Invasive Character of *Prosopis juliflora* Facilitated by its Allelopathy and a Wide Mutualistic Interaction with Soil Microorganisms. *Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 3, p. 115-123, 2018.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Editora UFLA, Lavras. 2002, 626p.

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

MUTURI, G. M., KARIUKI, J. G., POORTER, L., & MOHREN, G. M. Allometric equations for estimating biomass in naturally established *Prosopis* stands in Kenya. *Journal of Horticulture and Forestry*, v. 4, n. 4, p. 68-77, 2012.

NARDOTO GB, QUESADA CA, PATINˆO S, SAIZ G, BAKER TR, SCHWARZ M, SCHRODT F, FELDPAUSCH TR, DOMINGUES TF, MARIMON BS, MARIMON BH JR, VIEIRA ICG, SILVEIRA M, BIRD MI, PHILLIPS OL, LLOYD J, MARTINELLI LA (2014) Basin-wide variations in Amazon Forest nitrogen-cycling characteristics as inferred from plant and soil 15N:14N measurements. *Plant Ecol Divers* 7:173–187. doi:10.1080/17550874.2013. 807524

NORRIS, D. O.; MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, v. 29, n. 3, p. 214–235, 1964.

OBERSON, A., NANZER, S., BOSSHARD, C., DUBOIS, D., MÄDER, P., & FROSSARD, E. (2007). Symbiotic N₂ fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by ¹⁵N dilution and ¹⁵N natural abundance. *Plant and Soil*, 290(1-2), 69-83.

PEREIRA, J. C. D., & LIMA, P. C. F. Comparação da qualidade da madeira de seis espécies de algarobeira para a produção de energia. Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2002.

PETERSON B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 18, p. 293-320, 1987.

RAHARIMALALA, O., BUTTLER, A., SCHLAEPFER, R., & GOBAT, J. M. Quantifying biomass of secondary forest after slash-and-burn cultivation in Central Menabe, Madagascar. *Journal of Tropical Forest Science*, p. 474-489, 2012.

REICH, P. B.; OLEKSYN, J.; Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 30, p. 11001-11006, 2004.

RIBASKI, J. Comportamento da algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC) e do capim-búfel (*Cenchrus ciliaris* L.) em plantio consorciado, na região de Petrolina-PE. I Simpósio Brasileiro sobre Algaroba Mossoró: (Coleção Mossoroense). *Revista da Associação Brasileira de Algaroba*. 1 (2): 171-226, p. 358, série C, 1987.

RIBASKI, J. Influência da algaroba (*Prosopis juliflora* (SW.) DC.) sobre a disponibilidade e qualidade da forragem de capim-búfel (*Cenchrus ciliaris*) na região

semiárida brasileira. 2000. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RIBASKI, J., DRUMOND, M. A., DE OLIVEIRA, V. R., & NASCIMENTO, C. D. S. (2009). Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. *Embrapa Florestas - Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

RIEGELHAUPT, E., PAREYN, F., CRUZ FILHO, J. L. V., SILVA NETO, J. R., GOMES, M., & BACALINI, P. Manejo racional dos algarobais espontâneos para o combate à desertificação no Sertão de Pernambuco. S. l.: APNE, 2014.

RODRIGUES, L. C., SILVA, A. A., SILVA, R. B., OLIVEIRA, A. F. M., & ANDRADE, L. H. C. (2013). Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do Sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. *Revista Árvore*, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013.

ROGGY J. C., PRE`VOST M. F., GARBAYE J., DOMENACH A. M. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. *Journal of Tropical Ecology*, v. 15, n. 1, p. 1-22, 1999.

ROZENDAAL DMA, CHAZDON RL, ARREOLA-VILLA F, BALVANERA P, BENTOS TV, DUPUY JM, HERNÁNDEZ-STEFANONI JL, JAKOVAC CC, LEBRIJA-TREJOS EE, LOHBECK M, MARTÍNEZ-RAMOS M, MASSOCA PES, MEAVE JA, MESQUITA RCG, MORA F, PÉREZ-GARCÍA EA, ROMERO-PÉREZ IE, SAENZ-PEDROZA I, VAN BREUGEL M, WILLIAMSON GB, BONGERS F. Demographic drivers of aboveground biomass dynamics during secondary succession in neotropical dry and wet forests. *Ecosystems*, v. 20, n. 2, p. 340-353, 2017.

SALCEDO, I. H.; SAMPAIO, E. V. S. B. Matéria orgânica do solo no bioma caatinga. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 419-441.

SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; et al. Fixação simbiótica do N_2 em leguminosas tropicais. In FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; et al. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 17- 41.

SCAMBATO, A. A. Influência de la simbiosis con micorrizas arbusculares y rizobios sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés salino en especies forestales de *Prosopis*. 2013. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

SILVA, S. A., SOUZA, A. G., CONCEIÇÃO, M. M., ALENCAR, A. L., PRASAD, S., & CAVALHEIRO, J. M. O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. *Química Nova*, v. 24, p. 460-464, 2001.

Silva, G. C., & Sampaio, E. V. D. S. B. Biomassas de partes aéreas em plantas da caatinga. *Revista Árvore*, v. 32, n. 3, p. 567-575, 2008.

SILVA, A. F., DE FREITAS, A. D. S., COSTA, T. L., FERNANDES-JÚNIOR, P. I., MARTINS, L. M. V., E SILVA, C. E. D. R., ... & SAMPAIO, E. V. D. S. B. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 107, n. 3, p. 321-334, 2017.

SHEARER, G.; KOHL, D. H.; CHIEN, S. H. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 42, p. 899-905, 1978.

SHEARER, G.; KOHL, D.H.; VIRGINIA, R.A.; BRYAN, B.A.; SKEETERS, J.L.; NILSEN, E.T.; SHARIFE, M.R.; RUNDEL, P.W. Estimates of N₂-fixation from variation in the natural abundance of ¹⁵N in Sonoran Desert ecosystems. *Oecologia*, 56: 365-373, 1983.

SHEARER, G.; KOHL, D.H.; N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.13, p.699-756, 1986.

SLEIMAN, M.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C. & NOJIMOTO, T. Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, n.2, p.95-102, 2008.

SNYDER, J.D.; TROFYMOW, J. A. A rapid accurate wet oxidation diffusion procedure for determining organic and inorganic carbon in plant and soil samples. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. v.15, n.5, p.587-597, 1984.

SPIPKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; DOWSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 47, n. 8, p. 2607-2610, 2009. Disponível em: <doi:10.1128/JCM.00770-09>.

SOUZA, L.Q.; FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MOURA, P.M. & MENEZES, R.S.C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 1. Trees and shrubs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.94, p.171-179, 2012

Sylla, S. N., Ndoye, I., Gueye, M., Ba, A. T., & Dreyfus, B. Estimates of biological nitrogen fixation by *Pterocarpus lucens* in a semi arid natural forest park in Senegal using ¹⁵N natural abundance method. *African Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 50-56, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, p. 201-208, 2010.

UNKOVICH, M.; et al. Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. 291 p.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. METHOD 3052. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf> Acesso em 14/08/2017.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

VILLAGRA, G. M. L., & FELKER, P. Influence of understory removal, thinning and P fertilization on N₂fixation in a mature mesquite (*Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*) stand. Journal of Arid Environments, v. 36, n. 4, p. 591-610, 1997.

WANG, Y.-P.; HOULTON, B. Z.; FIELD, C. B. A model of biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, and phosphorus including symbiotic nitrogen fixation and phosphatase production. Global Biogeochemical Cycles, v. 21, n. 1, 2007.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. Journal of Bacteriology, Washington, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; MURAKAMI, T.; and BOONKERD, N. Natural abundance of ¹⁵N in tropical plants with emphasis on tree legumes. Plant and Soil, v. 153, n. 2, p. 295-304, 1993.

ZHOU, Y., BOUTTON, T. W., & WU, X. B. Soil C: N: P stoichiometry responds to vegetation change from grassland to woodland. Biogeochemistry, v. 140, n. 3, p. 341-357, 2018.