



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA – UNIPAMPA

IGOR RODRIGUES BRITO

**AÇÃO DA DICIANODIAMIDA NO CICLO DO NITROGÊNIO
MEDIADO PELA MICROBIOTA DE SOLOS ADUBADOS COM
COMPOSTOS ORGÂNICOS**

2017

IGOR RODRIGUES BRITO

**AÇÃO DA DICIANODIAMIDA NO CICLO DO NITROGÊNIO
MEDIADO PELA MICROBIOTA DE SOLOS ADUBADOS COM
COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como avaliação da disciplina Trabalho de
Conclusão de curso III obrigatória do curso de
Bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal do Pampa
Orientador: Luiz Fernando Roesch

São Gabriel

2017

IGOR RODRIGUES BRITO

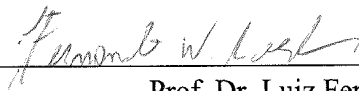
**AÇÃO DA DICIANODIAMIDA NO CICLO DO NITROGÊNIO
MEDIADO PELA MICROBIOTA DE SOLOS ADUBADOS COM
COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como avaliação da disciplina Trabalho de
Conclusão de curso III obrigatória do curso de
Bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal do Pampa

Área de concentração: Ecologia Microbiana

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 17/11/2017

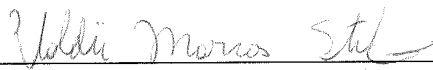
Banca Examinadora



Prof. Dr. Luiz Fernando Roesch

Orientador

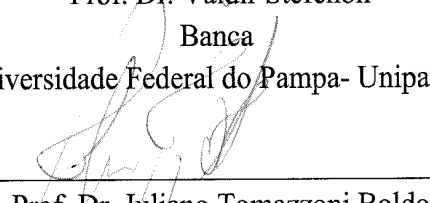
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Valdir Stefenon

Banca

Universidade Federal do Pampa- Unipampa



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Banca

Universidade Federal do Pampa- Unipampa

Dedico não exclusivamente a minha força de vontade e persistência, que embora não seja grande coisa, mas me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A oportunidade de conhecer esse lugar, tão longe e diferente do meu Pará, onde pude sentir o frio e provar o churrasco de que tanto ouvir falar.

A ausência familiar, que me fez enxergar, que agora sou um homem, e tenho que saber a sozinho, me virar.

Aos amigos, que me fizeram entender, em várias situações, que sem eles não podemos viver.

Aos momentos de tristeza, que de uma maneira dolorosa, me ensinaram que a vida tem espinhos, mas é linda, assim como uma rosa.

As disciplinas que rodei, que em muitas vezes me mostraram, que existem caminhos que não deixa ninguém contente, mas que ainda assim, precisamos seguir em frente.

Especialmente ao meu orientador, não querendo puxar saco, mas que por muito tempo me aturou.

"A mudança acontece quando a dor de permanecer o mesmo é maior que a dor da mudança".

- Tony Robbins

RESUMO

Na agricultura moderna, as fertilizações mineral e orgânica representam a maioria das emissões antropogênicas globais de N_2O . Uma estratégia para prevenir ou reduzir as emissões de gases de efeito estufa, como o N_2O , é o uso de inibidores de nitrificação, que inibem temporariamente a conversão microbiana do amônio do solo em nitrato. No entanto, faltam informações sobre os distúrbios causados pela fertilização orgânica com inibidor de nitrificação na comunidade microbiana. Aqui examinamos como a expressão dos genes envolvidos nos processos do ciclo do nitrogênio, nas comunidades microbiana do solo potencialmente ativas, mudaram ao longo do tempo pela adição de esterco de suíno tratado com dicianodiamida (DCD) e fertilizantes minerais. Uma análise *in silico* foi realizada a partir de sequências do rRNA 16S, obtidas no NCBI, de um experimento de campo (sucessão de milho / cereal em sistema de plantio direto) que foi realizada com os seguintes tratamentos: (I) controle não fertilizado, (II) aplicação superficial de nutrientes minerais, (III) aplicação superficial de esterco líquido suíno (IV) aplicação superficial de esterco líquido suíno com dicianodiamida. As amostras de solo foram coletadas aos 0, 3, 6, 11, 25 e 50 dias após o início do experimento. As sequências foram processadas usando o software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). A predição do metagenoma foi obtida usando o software PyCrust (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). Os solos tratados com esterco líquido suíno com e sem DCD apresentaram tendências no número de genes muito similares ao longo de 50 dias. Os solos tratados com esterco líquido suíno diferiram dos solos tratados com NPK e o controle. Os solos com esterco líquido suíno e NPK exibiram alterações na proporção de sequências temporariamente, mas o número de sequências mostrou a tendência de recuperar o estado original 50 dias após a fertilização. O inibidor da nitrificação, o DCD, não teve efeito sobre a atividade metabolicamente ativa relacionadas ao ciclo do nitrogênio.

Palavra-chave: Emissão de óxido nitroso, inibidor de nitrificação, adubo mineral, fertilizante orgânico, sequenciação de próxima geração e rRNA 16S

ABSTRACT

In modern agriculture, mineral and organic fertilization accounts for most of the global anthropogenic emissions of N₂O. One strategy to prevent or reduce emissions of greenhouse gases, such as N₂O, is the use of nitrification inhibitors, which temporarily inhibit the microbial conversion of soil ammonium to nitrate. However, information on the disturbances caused by organic fertilization with nitrification inhibitor in the microbial community is lacking. Here we examine how the expression of the genes involved in nitrogen cycle processes in potentially active soil microbial communities changed over time by the addition of pig manure treated with dicyanodiamide and mineral fertilizers. An in-silico analysis was performed from 16S rRNA sequences obtained from NCBI from a field experiment (corn / cereal succession under no-tillage system) that was performed with the following treatments: (I) unfertilized control, (II) superficial application of mineral nutrients, (III) superficial application of swine manure and (IV) superficial application of swine manure with dicyanodiamide. Soil samples were collected at 0, 3, 6, 11, 25 and 50 days after the start of the experiment. The sequences were processed using Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software. Prediction of the metagenome was obtained using the PyCrust software (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). Soils treated with swine manure with and without DCD showed trends in the number of very similar genes over 50 days. The swine manure and NPK treated soils showed changes in the proportion of sequences temporarily, but the number of sequences showed the tendency to recover the original state 50 days after fertilization. The nitrification inhibitor, the DCD, had no effect on the metabolically active activity related to the nitrogen cycle.

Keywords: Nitrous oxide emission, Nitrification inhibitor, Mineral fertilizer, Organic fertilizer, Next generation sequencing and 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Genes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio.....	21
Figure 2: Genes envolvidos no processo de nitrificação.....	22
Figure 3: Genes responsáveis pela etapa de desnitrificação.....	24
Figure 4: Análise de dois grupos no STAMP.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes envolvidas no metabolismo do Nitrogênio.....	17
--	----

Sumário

INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção dos dados	15
3.2 Obtenção da predição do metagenoma.....	15
3.3 Análise computacional	16
4 RESULTADO	17
4.1 Genes do ciclo do nitrogênio contidos no metagenoma.....	17
4.2.1 Genes envolvido na etapa de Fixação do Nitrogênio	20
4.2.2 Genes envolvidos na etapa de Desnitrificação	22
4.3 Análise dos genes no STAMP	25
5 DISCUSSÃO	26
6 REFERENCIA	30

INTRODUÇÃO

Com o surgimento de ferramentas genéticas moleculares na ecologia microbiana, tornou-se evidente que conhecemos apenas uma parte muito pequena da diversidade do mundo microbiano. A maior parte dessa diversidade microbiana inexplorada parece estar se escondendo na grande quantidade de bactérias não cultivadas (Schloter, Dilly e Munch., 2003). Com base em estudos moleculares, pode-se estimar que 1 g de solo é composto por mais de 10^9 bactérias pertencentes a cerca de 10.000 espécies microbianas diferentes (Øvreås e Torsvik, 1998).

A compreensão da diversidade microbiana e da função em ambientes complexos aumentou significativamente ao longo dos últimos 10 anos. Este é principalmente o resultado da introdução do sequenciamento da última geração (NGS) (Lozupone, Catherine A., and Rob Knight, 2007). O estudo das comunidades bacterianas por meio do sequenciamento dá-se com amplificação de regiões pequenas, mas altamente variáveis, do rDNA 16S (por exemplo, as regiões hipervariáveis de V3, V5 ou V6). Isso permitiu a identificação de populações raras em comunidades bacterianas que podem explicar a diversidade funcional e a capacidade dos ecossistemas (Kysela, David T., Carmen Palacios e Mitchell L. Sogin., 2005; Sogin, et al., 2006). As plataformas de sequenciamento NGS tornaram possível a obtenção de dados de sequência de DNA diretamente de amostras ambientais (Sogin, et al., 2006). Estes dados foram utilizados em uma variedade de aplicações, incluindo a caracterização de solo (Fierer et al., 2012); comparação de microbiota em indivíduos saudáveis *versus* doentes (Andersson, 2008; Zhang et al., 2009); inferindo a saúde de um ecossistema, analisando sua biodiversidade (Hajibabaei, 2011); estudando DNA antigo (Haile et al., 2009; Sønstebo et al., 2010; Boessenkool et al., 2012); e análise de fragmentos de DNA em fezes ou conteúdo intestinal (Deagle, Roger Kirkwood e Simon N. Jarman., 2009). Ao comparar as sequências obtidas com uma biblioteca de referências crescente de organismos conhecidos, os grupos de microrganismo presentes em uma amostra ambiental podem ser identificados com alta confiança (Shokralla et al., 2012). Avanços recentes nos procedimentos de extração de ácidos nucleicos e sequenciamento NGS, permitem a análise comparativa da diversidade de comunidades microbianas inteiras, abundância e genes funcionais em profundidades de sequenciamento muito maiores do que nunca (Pylro et al., 2014).

O uso de fertilizantes é um exemplo de fatores que influenciam à estrutura da comunidade microbiana (Mohanty et al., 2006). Os fertilizantes orgânicos e inorgânicos são usados principalmente para aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, mas também afetam os microrganismos do solo (Marschner et al., 2003). Alterações orgânicas do solo tem sido associada as propriedades desejáveis do solo, incluindo maior capacidade de retenção de água disponível na planta e CEC (*cation exchange capacity*) e menor densidade aparente e pode promover microrganismos benéficos (Drinkwater et al., 1995). O uso de fertilizante orgânicos, como esterco, a longo prazo resultam em aumentos significativos em C, N e biomassa microbiana do solo, bem como mudanças na estrutura da comunidade microbiana. O aumento de carbono do solo e fornecimento de nutrientes mineralizáveis, lentamente podem resultar em uma comunidade microbiana maior e potencialmente mais robusta (Peacock et al., 2001). A incorporação de fertilizantes orgânicos também pode aumentar a atividade microbiana em meio entre 16% e 20% em comparações com fertilizantes inorgânicos (Dinesh et al., 2010).

Conseqüentemente, os fertilizantes orgânicos podem estimular os processos microbianos do solo e aumentar os rendimentos das culturas em comparação com a adubação inorgânica (Diacono, Mariangela e Francesco Montemurro, 2010). No entanto, alguns estudos mostraram que os fertilizantes orgânicos podem aumentar o crescimento e o rendimento das culturas mesmo em uma única estação de crescimento e quando são aplicados em pequenas quantidades (Arancon et al., 2005), sugerindo a existência de algum tipo de mecanismo biológico que a curto prazo que promove o crescimento das plantas.

A poluição ambiental através da lixiviação de nutrientes ou o escoamento de campos fertilizados tornou-se uma grande preocupação (Zhang et al., 2010; Chaudhry, et al., 2009). Além disso, as adições de fertilizantes orgânicos resultam em poluição ambiental (por exemplo, contaminação por nitratos de águas subterrâneas, eutrofização de corpos d'água e aumento de amônia e emissões de gases de efeito estufa) quando o estrume é aplicado além da capacidade de retenção de solo ou acima dos requisitos de nutrientes da planta (LUO et al., 2010). As fontes dominantes de N_2O estão intimamente relacionadas aos processos de produção microbiana em solos, sedimentos e corpos d'água. As emissões agrícolas devido ao uso de fertilizantes nitrogenados e ao manejo do estrume ($4.3-5.8 \text{ Tg } N_2O-N \text{ ano}^{-1}$) e as emissões de solos naturais ($6-7 \text{ Tg } N_2O-N \text{ ano}^{-1}$) representam 56-70% de todas as fontes globais de N_2O (Syakila, Alfi e Carolien Kroeze, 2011). Primeiro, é um potente gás de efeito estufa (GEE), com um potencial de aquecimento global de 100 anos, 298 vezes o do dióxido de carbono (CO_2), contribuindo com 6,24% para o forçamento radiativo global (BUTTERBACH-BAHL et al., 2013). As estratégias para evitar impactos adversos no meio ambiente estão em desenvolvimento com o objetivo de prevenir e / ou reduzir as emissões de N_2O .

Uma das possíveis medidas de mitigação para reduzir as emissões de N_2O de solos agrícolas é usar inibidores de nitrificação para diminuir a conversão de NH_4^+ para NO_3^- no solo. A diciandiamida (DCD) demonstrou ser eficazes na redução das emissões de N_2O de fertilizantes nitrogenados ou fertilizantes orgânicos (Hatch et al., 2005; Merino et al., 2002). Os inibidores de nitrificação, como o DCD, funcionam desativando temporariamente a enzima amônia monioxigenase (AMO) de oxidantes de amônia do solo responsáveis pelo primeiro passo do processo de nitrificação, a conversão de amônia para hidroxilamina (Amberger, 1989; Di et al., 2010). Foi demonstrado que as emissões de N_2O dos remendos de urina animal podem ser reduzidas em 60 e 80% pelo uso de DCD (Smith, deKlein and Catto, 2008). DCD é bacteriostático em vez de bactericida e prejudica a atividade de bactérias oxidantes de amônia, restringindo a absorção ou utilização de amônio (ZACHERL; AMBERGER, 1990), reduzindo assim a produção de N_2O . Embora a literatura sobre os mecanismos e os benefícios dos inibidores de nitrificação seja extensa, houve poucos estudos sobre os efeitos não-alvo desses compostos agrícolas agora amplamente utilizados (CUTTLE, 2008). Em face da crescente evidência de que as mudanças na estrutura da comunidade microbiana podem levar a mudanças na função microbiana do solo, os efeitos dos inibidores de nitrificação na comunidade microbiana do solo devem ser considerados.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi determinar a atuação do DCD sobre a atividade metabólica do ciclo do nitrogênio na comunidade microbiana de solos tratados com esterco líquido suíno. Visto que, o DCD sendo um inibidor da nitrificação é utilizado para diminuir a emissão de N_2O em campos agrícolas com aplicação de fertilizantes. Este estudo visa esclarecer quais as alterações que este composto provoca na comunidade microbiana do solo.

2.2 Objetivos Específicos

- Observar se o DCD altera o número de sequências do RNA ribossomal dos genes envolvido no ciclo do nitrogênio;
- Identificar em qual dos dias de amostragem o DCD atuou de maneira mais intensa;
- Identificar em qual dos dias de amostragem o composto para de agir alterando o número de sequência, se o DCD altera o número de sequências dos genes do ciclo do nitrogênio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos dados

Os dados usados nesse trabalho foram produzidos por Suleiman (2016) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O experimento consistiu na aplicação de fertilizantes em solo sob um sistema de plantio direto de milho / trigo. Cada tratamento foi replicado três vezes em um delineamento de blocos ao acaso. Foram aplicados quatro tratamentos: (I) controle (não fertilizado); (II) aplicação superficial de ureia (NPK); (III) aplicação superficial de esterco líquido suíno (IV); e aplicação superficial de esterco líquido suíno com dicianidamida (esterco com DCD). A proporção de esterco suíno foi determinada para fornecer um fornecimento de N total de 130 e 140 kg total de N ha¹, equivalente à aplicação de ureia no tratamento II. As amostras de solo pré-experiência foram coletadas um dia antes (dia 0) e após 3, 6, 11, 25 e 50 dias de início do experimento para análises moleculares. O RNA total foi extraído de dois gramas de solo por amostra. O RNA microbiano também foi extraído de esterco de suínos utilizado para fertilização do solo com e sem adição de DCD em três repetições. Foi realizado a síntese de cDNA, utilizado para reações de PCR subsequentes. A região V4 do gene 16S rRNA foi ampliada e sequenciada usando PGM Ion Torrent (Life Technologies).

As sequências cruas resultantes do sequenciamento foram obtidas a partir do NCBI Sequence Read Archive sob o número de acesso SRX1294673, e o número de corrida SRR2533758.

3.2 Obtenção da predição do metagenoma

Os dados (armazenadas em um arquivo de formato fastq “reads.fastq”) provenientes do sequenciamento foram processadas utilizando o software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (Caporaso et al., 2010). As leituras no formato FASTQ foram divididas em arquivos FASTA e QUAL, usando o script *convert_fastaqual_fastq.py*. Os barcodes foram retirados e as sequências filtradas por qualidade, usando o script *split_libraries.py*, resultando o arquivo *seqs.fna*, arquivo necessário para se obter a tabela da OTU com o software Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) (LANGILLE et al., 2013).

Uma tabela da Unidade Taxonômica Operacional (OTU) foi construída usando o protocolo ‘closed reference’ do PICRUSt. Essas sequências foram agrupadas em OTUs com um limite de similaridade de 97%. Após o agrupamento em OTUs, as sequências foram alinhadas e os táxons foram classificados usando o banco de dados de referência Greengenes (versão 13.8) em uma porcentagem específica de identidade e foram descartadas todas as leituras que não atingiram a coleção de referência.

Para prever as proporções de sequências contidas na comunidade microbiana nos quatro tratamentos, o conjunto de dados rRNA 16S, previamente processados no software QIIME, foi processado usando o software PICRUSt (LANGILLE et al., 2013). A tabela OTU emitida foi normalizada de acordo com o número de sequências rRNA 16S por genoma e uma predição

funcional do metagenoma final foi criada. Para determinar diferenças estatísticas entre os metagenomas dos quatro tratamentos, foi usado o pacote de software STAMP (Parks et al., 2014).

Com o metagenoma predito, foram selecionadas apenas os genes relacionadas ao ciclo do nitrogênio, afim de identificar quais genes são alterados pela presença de DCD.

3. 3 Análise computacional

O teste de hipóteses estatísticas para análise de dois grupos foi realizado utilizando o teste t de Welch, enquanto os intervalos de confiança foram calculados usando o método invertido de Welch, sem correção. Enquanto que para análise de múltiplos grupos, foi realizado o teste ANOVA e o teste de Tukey-Kramer para o post-hoc.

Os genes envolvidos nas etapas do ciclo do nitrogênio foram selecionados utilizando a Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/> ou <http://www.kegg.jp/>), um recurso de banco de dados que integra informações genômicas, químicas e sistêmicas funcionais. Obtidos esses genes, pertencentes as etapas que os microrganismos realizam, foi feito a análise comparacional no STAMP (Parks et al., 2014). Para realizar o ensaio no STAMP, foi utilizado a análise de múltiplos grupos, ANOVA como teste estatístico, e Benjamini-Hochberg FDR como múltiplo teste de correção. Os dados gerados foram explorados por gráficos de caixa, com o intuito de separar os genes do ciclo do nitrogênio que apresentava maior diferença entre os tratamentos (esterco com DCD, esterco sem DCD, NPK e controle). Para análise da expressão dos genes dos diferentes tratamentos foi criado um arquivo de entrada, *profile* e *grupo metadata*, para cada dia (0, 3, 6, 11, 25 e 50).

Os dados dos genes do ciclo do nitrogênio, selecionados no STAMP, presentes no arquivo do genoma predito gerado no PICRUSt, foram utilizados para gerar uma análise dos genes dos diferentes tratamentos em todos os dias no Excel. O Excel se fez a melhor opção por possibilitar a visualização das proporções de sequências em todos os dias, não apenas em dias isolados que o STAMP promove.

O ensaio no Excel com os genes selecionados na análise de múltiplos grupos no STAMP, consistiu na organização dos genes com seus respectivos números de sequências dos tratamentos em triplicatas. Foi realizada a média das triplicatas dos genes selecionados, dos quatro tratamentos. Posteriormente, os genes foram alterados de número de sequências para proporção das sequências (%). Todos os genes foram convertidos para porcentagem, considerando como 100% a soma de todos os expressos. Com a proporção de sequência de todos os genes e de seus respectivos tratamentos foram gerados os gráficos. A expressão dos genes ao longo de 50 dias exibidos nos gráficos foi separada de acordo com sua função e etapas no ciclo do nitrogênio.

4 RESULTADO

4. 1 Genes do ciclo do nitrogênio contidos no metagenoma

As predições funcionais do metagenoma apresentaram todos os genes expressos na comunidade microbiana. Utilizando a enciclopédia KEGG foram encontrados no conteúdo funcional do metagenoma apenas os genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio. De todo conteúdo do metagenoma, foram retirados 70 genes envolvidos diretamente ou indiretamente ao metabolismo do nitrogênio. Dentre os 70 genes, 44 estão envolvidos nas etapas de fixação de nitrogênio, nitrificação e desnitrificação, etapas do ciclo do nitrogênio que são realizadas pelos microrganismos do solo. Entre os 44 genes do ciclo do nitrogênio, estão destacados em negrito os que apresentaram maiores diferenças entre os 4 tratamentos, na análise de múltiplos grupos no STAMP (Tabela 1). Dos genes da etapa de nitrificação, foram pouco os encontrados no metagenoma predito, conseqüentemente foram pouco os que apresentaram diferenças relevantes entre 4 os tratamentos, na análise de múltiplos grupos no STAMP. Enquanto que para etapa de desnitrificação houve um grande número de genes no metagenoma predito.

TABELA 1

Genes envolvidos no ciclo do nitrogênio. Em negrito, os genes que foram selecionados pelo STAMP na análise de múltiplos grupos.

	KEGG_Description
Fixação de Nitrogênio	<i>nitrogen fixation protein NifZ</i>
	<i>nitrogen fixation protein NifW</i>
	<i>nitrogen fixation protein NifT</i>
	<i>nitrogen fixation protein NifX</i>
	<i>nitrogen fixation protein NifB</i>
	<i>nitrogenase iron protein NifH</i>
	<i>nitrogen fixation protein NifU and related proteins</i>
	<i>NAD+---dinitrogen-reductase ADP-D-ribosyltransferase [EC:2.4.2.37]</i>
	<i>nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain [EC:1.18.6.1]</i>
	<i>nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1]</i>
	<i>nitrogenase molybdenum-iron protein NifN</i>
	<i>nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein NifE</i>
	<i>nitrogenase [EC:1.18.6.1]</i>
<i>nitrogenase (flavodoxin) [EC:1.19.6.1]</i>	
Nitrificação	<i>hydroxylamine oxidase [EC:1.7.3.4]</i>
	<i>ammonia monooxygenase subunit A [EC:1.13.12.-]</i>
	<i>ammonia monooxygenase subunit B [EC:1.13.12.-]</i>
	<i>ammonia monooxygenase subunit C [EC:1.13.12.-]</i>
Desnitrificação	<i>cytochrome c-552 [EC:1.7.2.2]; formate-dependent nitrite reductase, periplasmic cytochrome c552 subunit [EC:1.7.2.2]</i>
	<i>hydroxylamine reductase [EC:1.7.-.-]</i>
	<i>formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfG</i>
	<i>formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfF</i>
	<i>formate-dependent nitrite reductase, possible assembly protein;cytochrome c-type protein NrfE</i>
	<i>formate-dependent nitrite reductase, Fe-S protein;protein NrfC</i>
	<i>formate-dependent nitrite reductase, penta-haeme cytochrome c;cytochrome c-type protein NrfB</i>
	<i>nitrate reductase 1, alpha subunit [EC:1.7.99.4]</i>
	<i>nitrate reductase 1, beta subunit [EC:1.7.99.4]</i>
	<i>nitrate reductase 1, gamma subunit [EC:1.7.99.4]</i>
	<i>nitrate reductase 1, delta subunit [EC:1.7.99.4]</i>
	<i>nitrate reductase 2, alpha subunit</i>
	<i>nitrate reductase 2, beta subunit</i>
	<i>nitrate reductase 2, gamma subunit</i>
<i>nitrate reductase 2, delta subunit</i>	
<i>periplasmic nitrate reductase NapA [EC:1.7.99.4]</i>	

	<i>nitrate reductase catalytic subunit [EC:1.7.99.4]</i>
	<i>protein NrfD;formate-dependent nitrite reductase complex, transmembrane protein</i>
	<i>two-component system, NarL family, nitrate/nitrite response regulator NarP</i>
	<i>two-component system, NarL family, nitrate/nitrite response regulator NarL</i>
	<i>nitric oxide reductase NorQ protein [EC:1.7.99.7]</i>
	<i>nitric-oxide reductase NorD protein [EC:1.7.99.7]; nitric oxide reductase NorD protein</i>
	<i>nitric oxide reductase FlRd-NAD(+) reductase [EC:1.18.1.-]</i>
	<i>anaerobic nitric oxide reductase flavorubredoxin</i>
	<i>anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator</i>
	<i>nitric oxide dioxygenase [EC:1.14.12.17]</i>
	<i>Rrf2 family transcriptional regulator, nitric oxide-sensitive transcriptional repressor</i>
	<i>nitric oxide reductase, cytochrome b-containing subunit I [EC:1.7.2.5];nitric-oxide reductase, cytochrome b-containing subunit I [EC:1.7.99.7]</i>
	<i>nitric-oxide reductase, cytochrome c-containing subunit II [EC:1.7.99.7]; nitric oxide reductase, cytochrome c-containing subunit II</i>
	<i>nitrous oxidase accessory protein</i>
	<i>nitrous oxide reductase [EC:1.7.99.6]</i>
Outros genes do metabolismo do nitrogênio	<i>carbamoyl-phosphate synthase small subunit [EC:6.3.5.5]</i>
	<i>cyanate lyase [EC:4.2.1.104]</i>
	<i>two-component system, NtrC family, nitrogen regulation response regulator NtrX</i>
	<i>two-component system, NtrC family, nitrogen regulation sensor histidine kinase NtrY [EC:2.7.13.3]</i>
	<i>carbon-nitrogen hydrolase family protein</i>
	<i>nitrogen regulatory protein PII 2</i>
	<i>nitrogen regulatory protein PII 1</i>
	<i>quaternary ammonium compound-resistance protein SugE</i>
	<i>nitrogen regulatory protein P-II 2</i>
	<i>nitrite transporter NirC</i>
	<i>carbamoyl-phosphate synthase large subunit [EC:6.3.5.5]</i>
	<i>nitrogen regulatory protein P-II 1</i>
	<i>two-component system, NtrC family, nitrogen regulation response regulator GlnG</i>
	<i>two-component system, NtrC family, nitrogen regulation sensor histidine kinase GlnL [EC:2.7.13.3]</i>
	<i>aliphatic nitrilase [EC:3.5.5.7]</i>
	<i>nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]</i>
	<i>carbamate kinase [EC:2.7.2.2]</i>
<i>N,N-dimethylformamidase [EC:3.5.1.56]</i>	

4. 2 Análise dos genes do ciclo do nitrogênio

A análise dos genes do ciclo do nitrogênio (CN), em cada dia do experimento (0, 3, 6, 11, 25 e 50), mostrou a ação do composto dicianodiamida (DCD) ao longo de 50 dias. O número de sequências dos genes envolvidos no CN das amostras de solos fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD diferiram daquelas que receberam NPK ou controle. Foi observado que houve maior variação na proporção de sequências, entre os tratamentos com esterco líquido suíno e o tratamento com NPK ou controle, após 3 dias de exposição dos fertilizantes. Os solos fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD exibiram um número de sequências muito semelhantes entre si. Os genes que foram alterados pelo DCD, no decorrer dos 50 dias do experimento, apenas mostraram alterações nos dias 6 e 11. No dia 0, onde foi feita a amostragem do solo pré-experimento, não foi observada diferenças na proporção de sequências nos diferentes tratamentos. Não houve diferença na proporção de sequência entre os 4 tratamentos, no dia 0 e 50. O que demonstra que a comunidade microbiana alterada, no decorrer de 50 dias tende de ser como era no dia 0.

4. 2. 1 Genes envolvido na etapa de Fixação do Nitrogênio

O número total de sequências dos genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio (FBN) encontrados nos tratamentos fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD foi semelhante ao longo dos 50 dias de experimento, diferindo apenas dos tratamentos com NPK e controle (Fig. 1).

Os tratamentos fertilizados com NPK e o controle após o dia 3 e 6 apresentaram diferença no número de sequências dos genes da FBN.

Entretanto, nos dias 11, 25 e 50 o número de apenas alguns genes da FBN no tratamento com NPK tenderam ser similares aos números de genes encontrados nos tratamentos com esterco líquido suíno (Fig. 1, C-D e G-H).

Os genes codificantes da proteína *NifZ* (Fig. 1A), *NifW* (Fig. 1B), *NifU* (Fig. 1E) e a enzima dinitrogênio redutase (Fig. 1F), se mostraram em menor números no tratamento fertilizado com NPK comparado com os fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD ou controle.

O número de genes *NifW* apresentou maior diferenças, principalmente aos 25 dias após fertilização, em relação ao tratamento com NPK e os demais tratamento.

Houveram dias, nos quais o número de genes do tratamento controle tenderam a ser mais semelhante com os tratamentos com esterco líquido suíno do que com o qual continha NPK (Fig. 1, A-B e E-F).

Assim como, houveram dias nos quais o tratamento controle diferiu dos demais tratamentos (NPK e esterco líquido suíno com e sem DCD).

Cinco dos genes, foram mais expressos no tratamento controle, quando comparados com os demais tratamentos, após 6 dias do início do experimento (Fig. 1, C-D e G-I).

Com exceção o gene codificante da enzima nitrogenase, que apenas exibiu maior expressão no tratamento controle no dia 11 em relação aos tratamentos com NPK e esterco líquido suíno (Fig. 1I).

A maior diferença entre os tratamentos fertilizados com esterco líquido suíno e o fertilizado com NPK ou controle foi observado no dia 3.

Apenas 3 genes, dos encarregados pela FBN, apresentaram maior proporção de sequências nos tratamentos fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD (Fig. 1, A-B e F).

Contudo, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com esterco.

Apenas no dia 11, as proporções de sequências dos tratamentos fertilizado com esterco líquido suíno com DCD se mostrou menor que as do tratamento de esterco líquido suíno sem DCD (Fig. 1, D e G-I).

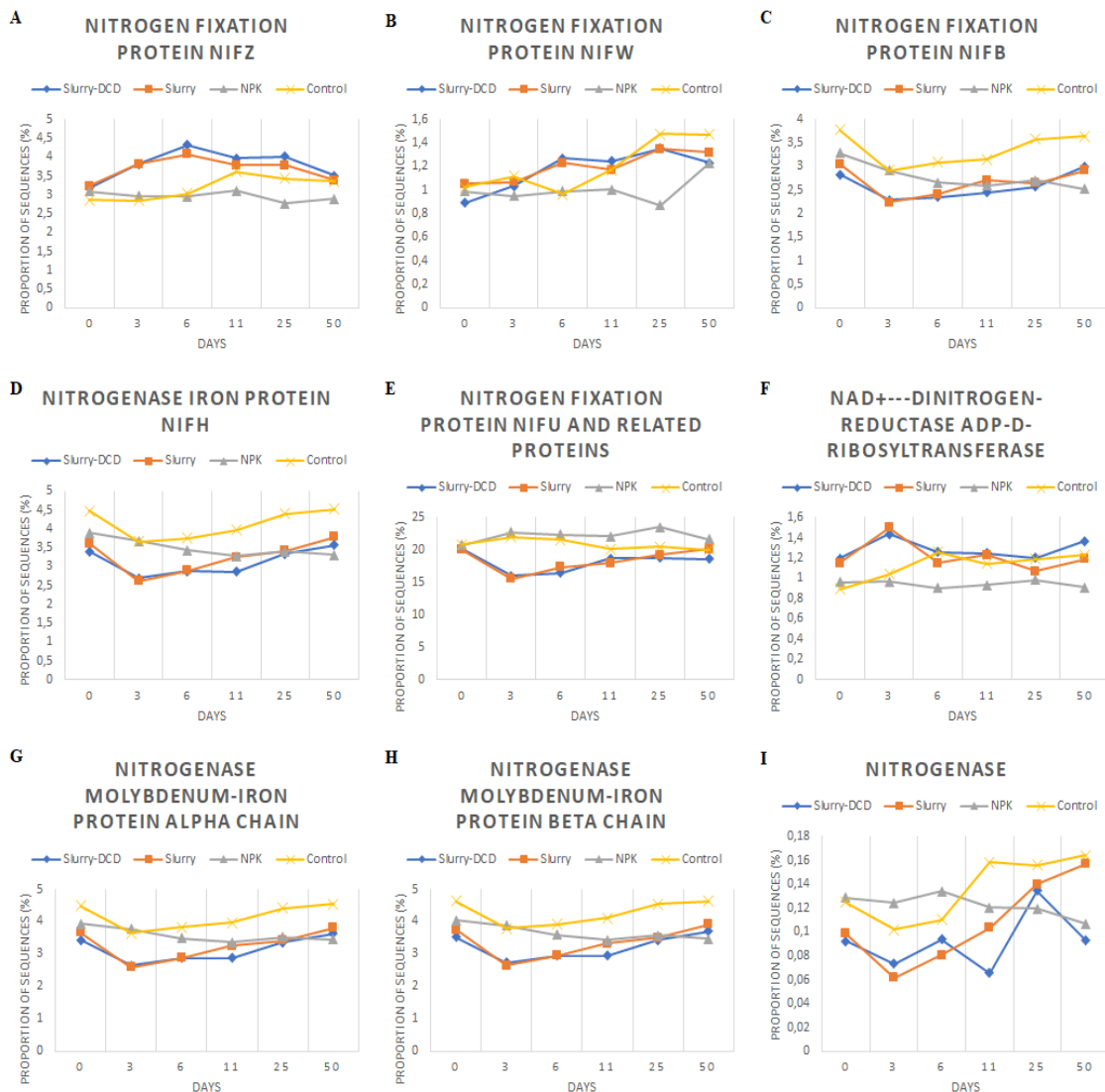


Fig. 1. Genes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio. Os tratamentos contendo esterco líquido suíno apresentaram menor número de seqüências que o tratamento com NPK e controle.

4. 2. 2 Genes envolvidos na etapa de Desnitrificação

4. 2. 2. 1 Genes com maior número de seqüência nos tratamentos com esterco

A etapa de desnitrificação teve o maior número de genes que apresentaram diferenças relevantes na análise de múltiplos grupos no STAMP que a etapa de fixação de nitrogênio. As diferenças na proporção de seqüências observadas, entre os tratamentos fertilizados com esterco líquido suíno (com e sem DCD) e o tratamento fertilizado com NPK ou controle, na etapa de FBN permaneceram na etapa de desnitrificação. Houve genes que, nos tratamentos fertilizados com esterco líquido suíno com e sem DCD, mostraram tendência a apresentar maior número de seqüências que os tratamentos fertilizados com NPK ou controle (Fig. 2).

Os genes codificantes das subunidades da enzima nitrato redutase (Fig. 2, A-D) e da enzima nitrato redutase do periplasma *NapA* (Fig. 2E) apresentaram tendências a ter o número

de sequências muito semelhante ao longo do experimento. Para ambas as enzimas, as proporções de genes foram mais abundantes no tratamento com esterco líquido suíno com e sem DCD no dia 3, quando comparado com o tratamento fertilizado com NPK ou controle. Nos dias posteriores ao dia 3, essas enzimas tenderam a diminuir o número de genes nos tratamentos com esterco líquido suíno. Reduzindo ao longo dos dias as diferenças com o tratamento fertilizado com NPK ou controle.

O gene encarregado da enzima óxido nítrico dioxigenase teve o número de sequências alterado após 3 dias a exposição do esterco líquido suíno (Fig. 2F). Os tratamentos com esterco líquido suíno com e sem DCD mostrou maior abundância de sequência que o tratamento com NPK e o controle. No entanto, o número de genes no tratamento com esterco com o pico de abundância no dia 3, foi reduzindo o número de sequência nos dias seguintes. A partir do dia 11, a abundância de genes nos 4 tratamentos permaneceu semelhante até o dia 50.

Houveram genes nos quais não se observou diferenças relevantes entre os tratamentos, apresentando tendências de expressão muito semelhantes entre os 4 tratamentos (Fig. 2, G-I).

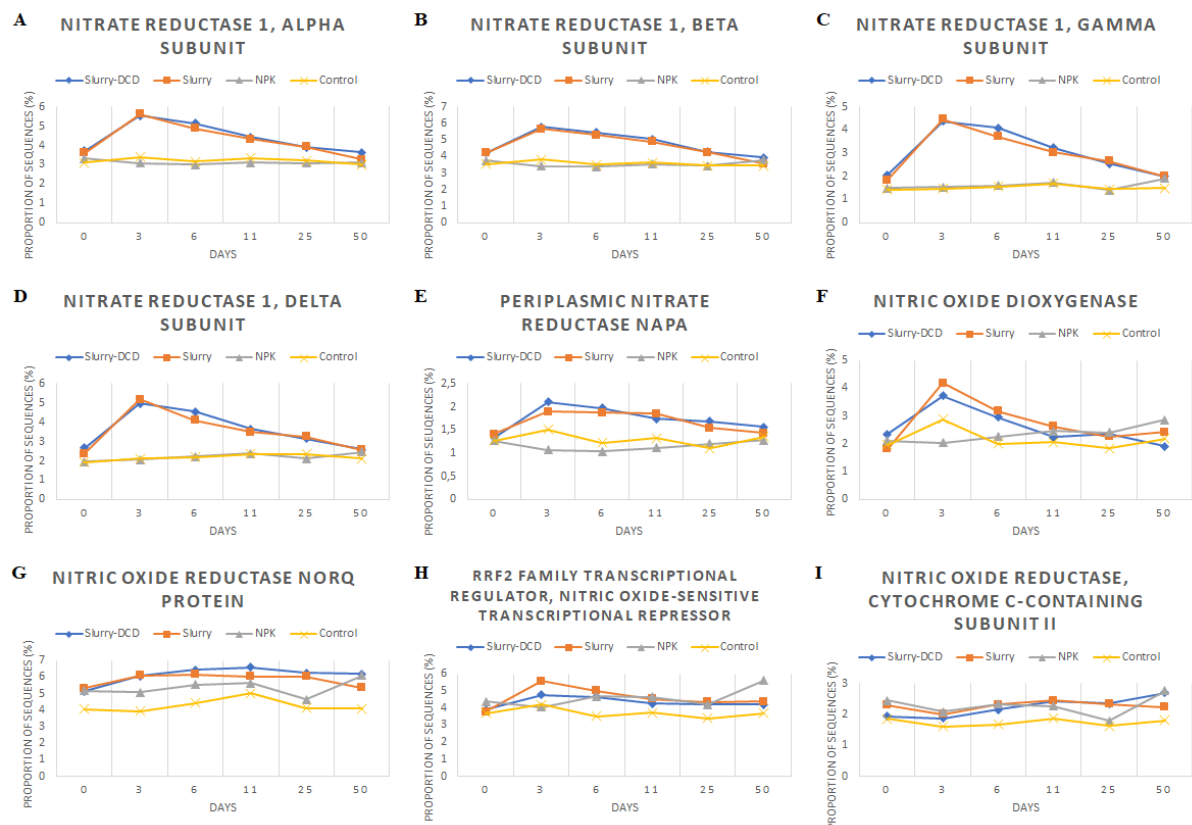


Fig. 2. Genes envolvidos no processo de desnitrificação que apresentaram maior número de sequências no tratamento com esterco líquido suíno.

4. 2. 2. 2 Genes com menor número de sequência nos tratamentos com esterco

O solo fertilizado com esterco promoveu redução no número de alguns genes quando comparado ao solo tratado com NPK e controle.

Dois genes relacionados ao óxido nítrico, foi observado que compartilham a mesmas tendências de sequência (Fig. 3, C-D). Apresentam as mesmas linhas de tendência para os quatro tratamentos, bem como a mesma proporção de sequências. Ambos os genes apresentaram maior diferença no dia 3 e 6, entre os tratamentos contendo esterco e o com NPK ou controle. Após o dia 6 as diferenças entre os tratamentos foram diminuindo.

O gene codificante da proteína NrfD demonstrou tendências muito variadas ao longo dos 50 dias (Fig. 3E). Até o dia 6, os tratamentos que continha NPK e o controle mostraram maior número de sequências que os tratamentos com esterco líquido suíno. Contudo, nos dias posteriores ao sexto dia, o tratamento que continha esterco líquido suíno com DCD e o controle mudaram bruscamente a abundância de sequências.

O gene encarregado da enzima hidroxilamina redutase manteve o número de sequências semelhante entre os tratamentos com esterco suíno (Fig. 3A). Enquanto que, entre o tratamento controle e o tratado com NPK houve uma diferença. O tratamento controle foi o que apresentou maior número de sequências que os demais tratamentos. A maior diferença entre os tratamentos com esterco líquido suíno e o com NPK ou controle, pode ser observado no dia 3. No dia 11, o tratamento com DCD mostrou menor número de sequência que os demais tratamentos.

O gene do citocromo c-552 apresentou diferenças nos números de genes entre os tratamentos com esterco líquido suíno e o com NPK ou controle (Fig. 3B). O tratamento controle foi o que mostrou maior número de sequência que os demais tratamentos, em todos os dias de experimento.

Houve genes que não apresentaram grande variação ao longo dos 50 dias, bem como não apresentaram diferenças relevantes entre os tratamentos (Fig. 3, F e G).

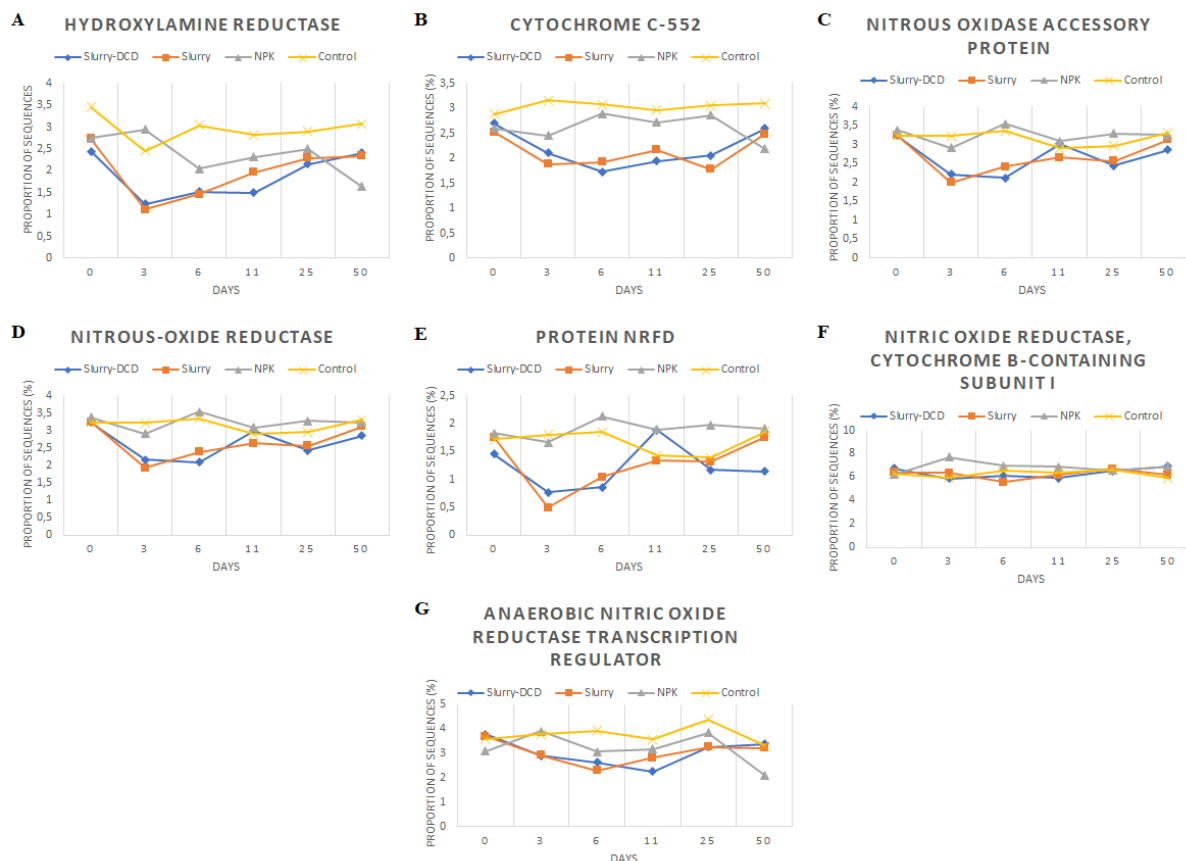


Fig. 3. Genes envolvidos no processo de desnitrificação que apresentaram menor número de sequências nos tratamentos com esterco líquido suíno.

4. 3 Análise dos genes no STAMP

Foi observado nas análises das tendências da expressão dos genes ao longo de 50 dias que o tratamento com esterco líquido suíno com e sem DCD apresentaram a proporção de sequências muito semelhantes. Para identificar quais genes diferiram significativamente entre os tratamentos com esterco líquido suíno, foi realizado a análise no STAMP. O ensaio no STAMP consistiu na análise de dois grupos (esterco líquido suíno com DCD e esterco líquido suíno sem DCD), usando o teste estatístico Kruskal-Wallis H-test. Os resultados foram explorados por meio do gráfico de barras de erro (Fig. 4).

No dia o tratamento com esterco líquido suíno contendo DCD mostrou menor número de genes que o tratamento com esterco líquido suíno sem DCD (Fig. 4A), como mostrado na análise da tendência ao longo dos 50 dias no Excel (Fig. 2H). No dia 6, o gene da proteína *NifB* foi menos expressa no tratamento com esterco líquido suíno contendo DCD que o tratamento de esterco líquido suíno sem DCD (Fig. 4B). No entanto, na análise de tendência essa diferença não pode ser observada (Fig. 1C). No ensaio do dia 11, dois genes, da enzima hidroxilamina redutase e regulador de transcrição de óxido nítrico redutase, apresentou menos transcritos no tratamento de esterco líquido suíno com DCD que o tratamento de esterco líquido suíno sem DCD (Fig. 4C). No dia 25, a análise no STAMP resultou em diferenças significativas entre os tratamentos com esterco líquido suíno. Contudo, no dia 50, o tratamento com esterco líquido

suíno com DCD exibiu maior proporção de transcritos da subunidade I da enzima óxido nítrico redutase que o tratamento de esterco líquido suíno sem DCD (Fig. 4C)

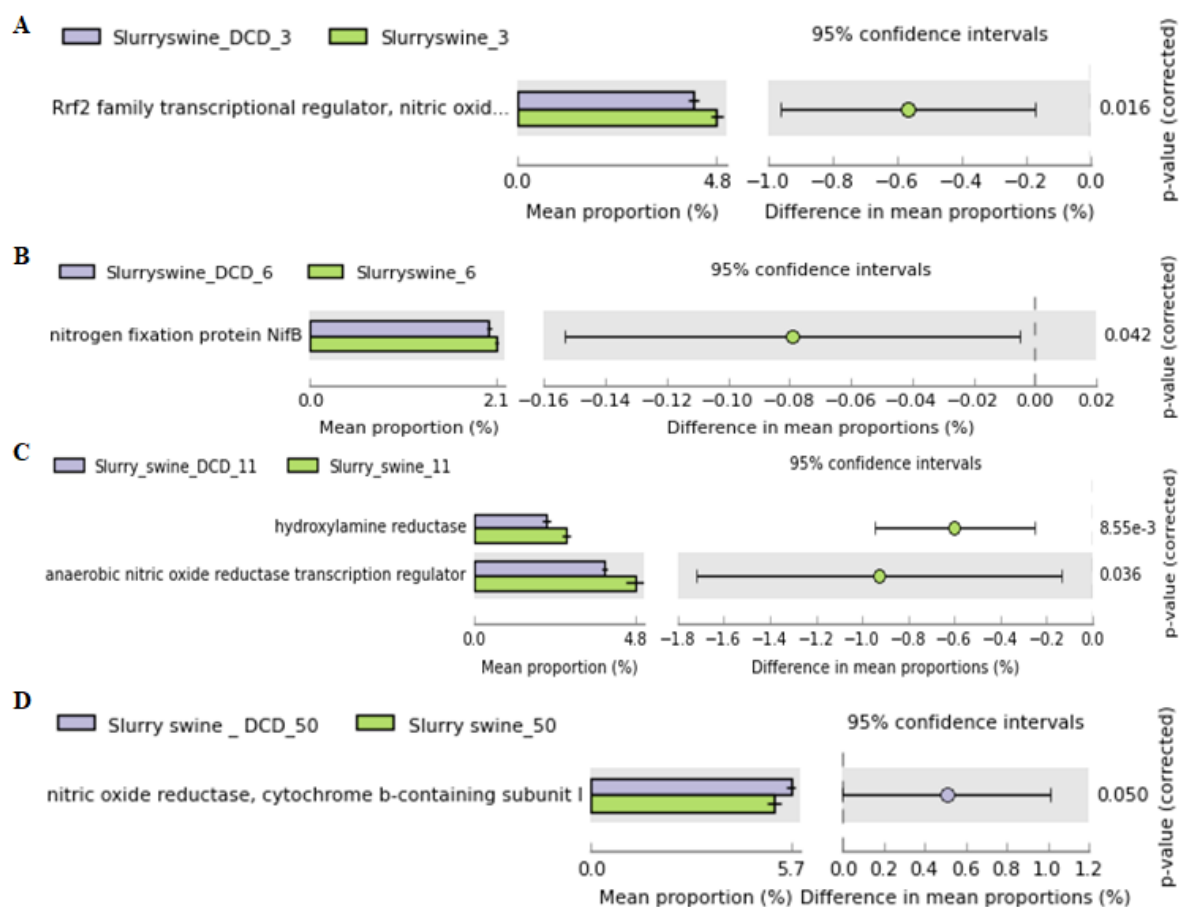


Fig. 4. Análise de dois grupos no STAMP dos tratamentos contendo esterco líquido suíno com e sem DCD. O tratamento fertilizado com esterco líquido suíno com DCD apresentar menor proporção de sequências que o tratamento com esterco líquido suíno sem DCD.

5 DISCUSSÃO

Nas informações observadas na análise de tendências das proporções de sequências, não foi possível identificar alterações relevantes causadas pelo tratamento com esterco líquido suínos contendo DCD. O número de sequências foi semelhante na presença ou ausência de DCD nos tratamentos com esterco, indicando que o composto dicianodiamida não afeta a proporção de cópia dos genes envolvido no ciclo do nitrogênio. Segundo Suleiman (2016), o DCD não apresenta efeito sobre a atividade metabólica da comunidade microbiana e foi específico da via, tendo impacto apenas em nitrificadores durante um período de curto prazo, o que, por sua vez, reduziu as emissões de N_2O . É bem compreendido, que o DCD bloqueia temporariamente o sítio ativo da enzima amônia monooxigenase, reduzindo o crescimento de microrganismos envolvidos no primeiro passo do processo de nitrificação (Prosser e Graeme, 2012) e as emissões de N_2O em uma média de 82% (Di, H. J., e K. C. Cameron, 2002). Embora,

ocorra a redução de N_2O , esse estudo demonstro que o DCD não afeta a expressão dos genes relacionados ao N_2O .

A exposição de esterco suíno no solo resultou em maiores alterações no número de cópias gênicas que o tratamento com NPK e o controle. A aplicação do estrume pode ter uma influência maior nas comunidades microbianas do solo do que as aplicações não fertilizadas ou fertilizantes minerais (Williams et al., 2013; Dong et al., 2014). Houveram genes que apresentaram menor número de cópia de genes no tratamento com esterco; enquanto outros mostraram maior abundância de sequências.

Os resultados obtidos demonstram que o DCD não afeta significativamente a abundância dos genes da fixação biológica do nitrogênio (FBN). A única evidência da atuação do composto pode ser observada no dia 11 na tendência de alguns genes relacionados à FBN. No entanto, esse não pode ser um efeito direto do DCD. Segundo Suleiman (2016), no dia 11, o teor de NO_3 no solo tratado com esterco líquido suíno com DCD foi maior que o esterco sem DCD, evidenciando que o DCD perdeu rapidamente o efeito inibidor. Ou seja, no dia 11, não há mais o efeito inibidor sobre a enzima amônio monoxigenase (AMO). Não se pode generalizar, que o DCD irá atuar da mesma forma em todas as funções.

Houveram genes dos envolvidos no processo de desnitrificação que mostraram maior número de sequências nos tratamentos com esterco líquido suíno. Os genes encarregados pela enzima que realiza redução de nitratos foram os quais apresentaram maior número de sequência. A redução de nitrato pode ser catalisada por uma membrana associada ou por uma redutase de nitrato periplasmática solúvel. Algumas bactérias expressam ambas as enzimas (RICHARDSON et al., 2001.). A nitrato redutase catalisa a redução de nitrato para nitrito. O nitrito formado por redução de nitrato pode ser reduzido a amônio ou a óxido nítrico por diferentes tipos de nitrato redutases (Moreno-Vivián, et al., 1999). Em um estudo sobre o efeito de fertilizantes orgânico e inorgânico no processo de desnitrificação foi observado que os fertilizantes orgânicos atuam intensificando a desnitrificação (ENWALL et al., 2005.). Validando o que foi encontrado nesse estudo, pelo menos em relação a esta enzima.

O gene responsável pela função de óxido nítrico dioxigenase também apresentou maior número de cópias no solo tratado com esterco líquido suíno que o solo com NPK e o controle. A dioxigenação do óxido nítrico (NO) é feita pela enzima flavohemoglobina (flavoHbs), que também apresenta a função de desintoxicação. FlavoHbs são induzidas por NO, nitrito, nitrato e liberadores de NO em várias bactérias, e esses flavoHbs protegem bactérias contra inibição do crescimento e danos mediados por NO durante exposições a agentes de liberação de NO ou NO autênticos (GARDNER et al., 2000). A alta taxa de N disponível no solo pelo uso de esterco suíno orgânico pode representar um estresse, podendo dessa forma induzir o maior número de óxido nítrico dioxigenase.

Assim como houveram genes envolvidos no processo de desnitrificação, que apresentaram maior número de sequência, houve também aqueles que mostraram menor número de cópias no tratamento com esterco líquido suíno que os tratamentos com NPK e o controle. Dentre os genes que exibiram menor número de cópias, dois se mostraram muito similares em relação à proporção de sequência e as linhas de tendências dos 4 tratamentos. O gene codificante da enzima óxido nítrico redutase e da proteína acessória de oxidase nítrica apresentaram as mesmas proporções de sequências. Podendo haver alguma relação entre os dois produtos gênicos. A enzima óxido nítrico (N_2OR) redutase transforma o óxido nítrico (N_2O)

em N_2 , catalisa o último passo da via de desnitrificação (PAULETA et al., 2013.). Enquanto, que a proteína acessória de oxidase nitrosa é codificada pelo gene *NosD*, é uma proteína periplasmática envolvida na inserção de cobre (Cu) no produto do gene *NosZ* (ZUMFT, 1997). A enzima óxido nitroso redutase é produto do gene *nosZ*. A biossíntese dos dois centros de Cu desta enzima depende de proteínas acessórias cujas funções e posições exatas na via de maturação *NosZ* não são bem conhecidas (WUNSCH et al., 2003). A enzima óxido nitroso redutase depende da proteína acessória para aquisição de Cu, explicando o porquê desses apresentarem similaridade na proporção de sequências.

O gene da proteína NrfD foi dos quais exibiu baixa proporção de sequência no tratamento com esterco líquido suíno quando comparado com o tratamento com NPK e controle. A NrfD é uma proteína transmembrana que não é bem conhecida (STEIN et al., 2016). A família NrfD é constituída por proteínas integradas de membrana que reúnem locais de ligação a quinonas (ROTHERY et al., 2008). NrfD provavelmente funcionam para oxidar o menaquinol com os elétrons que passam para 16Fe-ferredoxinas localizadas no periplasma. Proteínas NrfD estão relacionadas ao sistema de nitrito redutase periplasmática de *E. coli* e *Haemophilus influenzae* (HUSSAIN et al., 1994; FLEISCHMANN et al., 1995). NrfD é a subunidade de membrana integral da enzima nitrito redutase em *E. coli* (ROTHERY et al., 2008). A extremidade N-terminal hospeda o local de ligação a quinonas e a extremidade C-terminal está envolvido na translocação e absorção de prótons a partir do citoplasma (MAJUMDER et al., 2013.). Pouco se sabe da função dessa proteína, no entanto, sabe-se que ela está relacionada à redução de nitrito.

O gene encarregado pela enzima hidroxilamina redutase (HCP) foi um dos quais se mostrou com menor sequência no tratamento com esterco líquido suíno que o tratamento com NPK e o controle. A hidroxilamina redutase é uma enzima que catalisa a reação de redução da hidroxilamina à amônia (DAM et al., 2012). A proteína HCP está implicada na defesa de *Salmonella enterica* contra o estresse de nitrogênio (GILBERTHORPE et al., 2007). Seth et al (2012) demonstrou a importância da HCP na defesa de *E. coli* contra o NO derivado de macrófagos. Os resultados da atividade enzimática da hidroxilamina redutase na rizosfera e não-rizosfera de *K. obovata* aumentou significativamente com adição de nitrogênio exógeno (WENG et al., 2013.). A alta taxa de N disponível no solo pelo uso de esterco suíno orgânico pode representar um estresse, podendo dessa forma induzir o maior número de sequências de hidroxilamina redutase.

O gene responsável pela enzima citocromo c-552 também demonstrou menor proporção de sequência no tratamento com esterco em comparação com o tratamento com NPK e controle. Os primeiros estudos sobre citocromos solúveis em Enterobacteriaceae e a primeira caracterização da enzima citocromo c552 foram feitos por Fujita (1966), pesquisa sobre multi-heme da enzima nitrito redutase, especialmente em função de seu papel bioquímico fundamental no ciclo de nitrogênio (transformação NO_2^- para NH_3). Hoje em dia, a enzima é conhecida como penta-heme citocromo c nitrito redutase (ou NrfA), cuja função é catalisar a redução de nitrito respiratório em amônio (SIMON, 2002). Esta enzima normalmente é expressa em condições de crescimento anóxicas ou micro-óxicas na presença de nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2) (POOCK et al., 2002.).

No presente estudo, os tratamentos com o esterco líquido suíno mostraram efeitos substancialmente negativos sobre a o número de sequência gênicas, o que como pode afetar o

metabolismo bacteriano do solo. Aplicação de esterco reduziu significativamente o metabolismo de funções envolvidas no ciclo do nitrogênio, observado claramente na diminuição do número de sequências de muitos genes envolvidos no ciclo do nitrogênio.

Em conclusão, o composto dicianodiamida parece não alterar a atividade metabólica das funções encarregadas de processar as etapas do ciclo do nitrogênio. O DCD não atua inibindo ou estimulando a expressão dos genes do ciclo do nitrogênio. No entanto, esse estudo foi realizado analisando apenas o número de sequências do RNA ribossomal da região 16S. No entanto, as evidências de atuação do DCD são sobre uma enzima, a amônia monooxigenase. Mais estudos são necessários para se entender a ação do DCD na comunidade microbiana. A começar por analisando a interação do composto com proteínas.

6 REFERENCIA

- Amberger, A. “Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook”. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 20, n° 19–20 (1989): 1933–1955.
- Andersson, Anders F., Mathilda Lindberg, Hedvig Jakobsson, Fredrik Bäckhed, Pål Nyrén, e Lars Engstrand. “Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing”. *PloS one* 3, n° 7 (2008): e2836.
- Arancon, Norman Q., Clive A. Edwards, Peter Bierman, James D. Metzger, e Chad Lucht. “Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field”. *Pedobiologia* 49, n° 4 (2005): 297–306.
- Boessenkool, Sanne, Laura S. Epp, James Haile, Eva Bellemain, Mary Edwards, Eric Coissac, Eske Willerslev, e Christian Brochmann. “Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA”. *Molecular ecology* 21, n° 8 (2012): 1806–1815.
- Bowers, Robert M., Amy P. Sullivan, Elizabeth K. Costello, Jeff L. Collett, Rob Knight, e Noah Fierer. “Sources of bacteria in outdoor air across cities in the midwestern United States”. *Applied and environmental microbiology* 77, n° 18 (2011): 6350–6356.
- Butterbach-Bahl, Klaus, Elizabeth M. Baggs, Michael Dannenmann, Ralf Kiese, e Sophie Zechmeister-Boltenstern. “Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls?” *Phil. Trans. R. Soc. B* 368, n° 1621 (2013): 20130122.
- Caporaso, J. Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Elizabeth K. Costello, Noah Fierer, Antonio Gonzalez Peña, Julia K. Goodrich, e Jeffrey I. Gordon. “QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data”. *Nature methods* 7, n° 5 (2010): 335–336.
- Caporaso, J. Gregory, Konrad Paszkiewicz, Dawn Field, Rob Knight, e Jack A. Gilbert. “The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank”. *The ISME journal* 6, n° 6 (2012): 1089–1093.

- Chaudhry, A. N., G. Jilani, M. A. Khan, e T. Iqbal. “Improved Processing of Poultry Litter Reduces Nitrate Leaching and Enhances Its Fertilizer Quality”. *Asian Journal of Chemistry* 21, n° 7 (2009): 4997.
- Cuttle, S. P. “Impacts of pastoral grazing on soil quality”. *Environmental impacts of pasture-based farming*. CAB International, Wallingford, 2008, 33–74.
- Dam, Bomba, Somasri Dam, Michael Kube, Richard Reinhardt, e Werner Liesack. “Complete genome sequence of *Methylocystis* sp. strain SC2, an aerobic methanotroph with high-affinity methane oxidation potential”. *Journal of bacteriology* 194, n° 21 (2012): 6008–6009.
- Deagle, Bruce E., Roger Kirkwood, e Simon N. Jarman. “Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces”. *Molecular ecology* 18, n° 9 (2009): 2022–2038.
- Di, H. J., e K. C. Cameron. “The use of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), to decrease nitrate leaching and nitrous oxide emissions in a simulated grazed and irrigated grassland”. *Soil use and management* 18, n° 4 (2002): 395–403.
- Di, Hong J., Keith C. Cameron, Ju-Pei Shen, Chris S. Winefield, Maureen O’Callaghan, Saman Bowatte, e Ji-Zheng He. “Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions”. *FEMS microbiology ecology* 72, n° 3 (2010): 386–394.
- Diacono, Mariangela, e Francesco Montemurro. “Long-term effects of organic amendments on soil fertility. A review”. *Agronomy for sustainable development* 30, n° 2 (2010): 401–422.
- Dinesh, R., V. Srinivasan, S. Hamza, e A. Manjusha. “Short-term incorporation of organic manures and biofertilizers influences biochemical and microbial characteristics of soils under an annual crop [Turmeric (*Curcuma longa* L.)]”. *Bioresource technology* 101, n° 12 (2010): 4697–4702.
- Dong, Wen-Yi, Xin-Yu Zhang, Xiao-Qin Dai, Xiao-Li Fu, Feng-Ting Yang, Xi-Yu Liu, Xiao-Min Sun, Xue-Fa Wen, e Sean Schaeffer. “Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China”. *Applied Soil Ecology* 84 (2014): 140–147.

Drinkwater, L. E., D. K. Letourneau, FAHC Workneh, A. H. C. Van Bruggen, e C. Shennan. “Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California”. *Ecological applications* 5, n° 4 (1995): 1098–1112.

Enwall, Karin, Laurent Philippot, e Sara Hallin. “Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization”. *Applied and environmental microbiology* 71, n° 12 (2005): 8335–8343.

Fierer, Noah, Christian L. Lauber, Kelly S. Ramirez, Jesse Zaneveld, Mark A. Bradford, e Rob Knight. “Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients”. *The ISME journal* 6, n° 5 (2012): 1007–1017.

Fleischmann, Robert D., Mark D. Adams, Owen White, Rebecca A. Clayton, Ewen F. Kirkness, Anthony R. Kerlavage, Carol J. Bult, Jean-Francois Tomb, Brian A. Dougherty, e Joseph M. Merrick. “Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd”. *science*, 1995, 496–512.

FUJITA, TAKESHI, e RYO SATO. “Studies on soluble cytochromes in Enterobacteriaceae”. *The Journal of Biochemistry* 62, n° 2 (1967): 230–238.

Gardner, Paul R., Anne M. Gardner, Lori A. Martin, Yi Dou, Tiansheng Li, John S. Olson, Hao Zhu, e Austen F. Riggs. “Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition”. *Journal of Biological Chemistry* 275, n° 41 (2000): 31581–31587.

Gilberthorpe, Nicola J., Margaret E. Lee, Tania M. Stevanin, Robert C. Read, e Robert K. Poole. “NsrR: a key regulator circumventing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative and nitrosative stress in vitro and in IFN- γ -stimulated J774. 2 macrophages”. *Microbiology* 153, n° 6 (2007): 1756–1771.

Haile, James, Duane G. Froese, Ross DE MacPhee, Richard G. Roberts, Lee J. Arnold, Alberto V. Reyes, Morten Rasmussen, Rasmus Nielsen, Barry W. Brook, e Simon Robinson. “Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, n° 52 (2009): 22352–22357.

- Hajibabaei, Mehrdad, Shadi Shokralla, Xin Zhou, Gregory AC Singer, e Donald J. Baird. “Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos”. *PLoS one* 6, n° 4 (2011): e17497.
- Hartmann, Martin, Beat Frey, Jochen Mayer, Paul Mäder, e Franco Widmer. “Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming”. *The ISME journal* 9, n° 5 (2015): 1177–1194.
- Hatch, D., H. Trindade, L. Cardenas, J. Carneiro, J. Hawkins, D. Scholefield, e D. Chadwick. “Laboratory study of the effects of two nitrification inhibitors on greenhouse gas emissions from a slurry-treated arable soil: impact of diurnal temperature cycle”. *Biology and Fertility of soils* 41, n° 4 (2005): 225–232.
- Hussain, Haitham, Jane Grove, Lesley Griffiths, Stephen Busby, e Jeff Cole. “A seven-gene operon essential for formate-dependent nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria”. *Molecular microbiology* 12, n° 1 (1994): 153–163.
- Kysela, David T., Carmen Palacios, e Mitchell L. Sogin. “Serial analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6): a method for efficient, high-throughput analysis of microbial community composition”. *Environmental Microbiology* 7, n° 3 (2005): 356–364.
- Langille, Morgan GI, Jesse Zaneveld, J. Gregory Caporaso, Daniel McDonald, Dan Knights, Joshua A. Reyes, Jose C. Clemente, Deron E. Burkepile, Rebecca L. Vega Thurber, e Rob Knight. “Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences”. *Nature biotechnology* 31, n° 9 (2013): 814–821.
- Lin, X. G., R. Yin, H. Y. Zhang, J. F. Huang, R. R. Chen, e Z. H. Cao. “Changes of soil microbiological properties caused by land use changing from rice–wheat rotation to vegetable cultivation”. *Environmental Geochemistry and Health* 26, n° 2 (2004): 119–128.
- Lozupone, Catherine A., e Rob Knight. “Global patterns in bacterial diversity”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, n° 27 (2007): 11436–11440.

- Luo, J., C. A. M. De Klein, S. F. Ledgard, e S. Saggart. "Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review". *Agriculture, Ecosystems & Environment* 136, n° 3 (2010): 282–291.
- Majumder, Erica LW, Jeremy D. King, e Robert E. Blankenship. "Alternative Complex III from phototrophic bacteria and its electron acceptor auracyanin". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1827, n° 11 (2013): 1383–1391.
- Marschner, Petra, Ellen Kandeler, e Bernd Marschner. "Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment". *Soil Biology and Biochemistry* 35, n° 3 (2003): 453–461.
- Marx, M.-C., M. Wood, e S. C. Jarvis. "A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils". *Soil biology and biochemistry* 33, n° 12 (2001): 1633–1640.
- Merino, P., J. M. Estavillo, L. A. Gracioli, M. Pinto, M. Lacuesta, A. Munoz-Rueda, e C. Gonzalez-Murua. "Mitigation of N₂O emissions from grassland by nitrification inhibitor and Actilith F2 applied with fertilizer and cattle slurry". *Soil use and management* 18, n° 2 (2002): 135–141.
- Mohanty, Santosh R., Paul LE Bodelier, Virgilio Floris, e Ralf Conrad. "Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils". *Applied and Environmental Microbiology* 72, n° 2 (2006): 1346–1354.
- Moreno-Vivián, Conrado, Purificación Cabello, Manuel Martínez-Luque, Rafael Blasco, e Francisco Castillo. "Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases". *Journal of bacteriology* 181, n° 21 (1999): 6573–6584.
- Øvre\as, L., e V. Torsvik. "Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities". *Microbial ecology* 36, n° 3–4 (1998): 303–315.
- Parks, Donovan H., Gene W. Tyson, Philip Hugenholtz, e Robert G. Beiko. "STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles". *Bioinformatics* 30, n° 21 (2014): 3123–3124.

- Pauleta, Sofia R., Simone Dell'Acqua, e Isabel Moura. "Nitrous oxide reductase". *Coordination Chemistry Reviews* 257, n° 2 (2013): 332–349.
- Peacock, A. ggrD, M. D. Mullen, D. B. Ringelberg, D. D. Tyler, D. B. Hedrick, P. M. Gale, e D. C. White. "Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications". *Soil Biology and Biochemistry* 33, n° 7 (2001): 1011–1019.
- Poock, Susannah R., Emily R. Leach, James WB Moir, Jeffrey A. Cole, and David J. Richardson. 'Respiratory Detoxification of Nitric Oxide by the Cytochrome c Nitrite Reductase of Escherichia Coli', *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002), 23664–23669
- Prosser, James I., e Graeme W. Nicol. "Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation". *Trends in microbiology* 20, n° 11 (2012): 523–531.
- Pylro, Victor S., Luiz Fernando W. Roesch, Daniel K. Morais, Ian M. Clark, Penny R. Hirsch, e Marcos R. Tótoia. "Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms". *Journal of microbiological methods* 107 (2014): 30–37.
- Richardson, D. J., B. C. Berks, D. A. Russell, S. Spiro, e C. J. Taylor. "Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases". *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58, n° 2 (2001): 165–178.
- Rothery, Richard A., Gregory J. Workun, e Joel H. Weiner. "The prokaryotic complex iron–sulfur molybdoenzyme family". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778, n° 9 (2008): 1897–1929.
- Schlöter, M., O. Dilly, e J. C. Munch. "Indicators for evaluating soil quality". *Agriculture, Ecosystems & Environment* 98, n° 1 (2003): 255–262.
- Seth, Divya, Alfred Hausladen, Ya-Juan Wang, e Jonathan S. Stamler. "Endogenous protein S-Nitrosylation in E. coli: regulation by OxyR". *Science* 336, n° 6080 (2012): 470–473.

Shokralla, Shadi, Jennifer L. Spall, Joel F. Gibson, e Mehrdad Hajibabaei. “Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research”. *Molecular ecology* 21, n° 8 (2012): 1794–1805.

Simon, Jörg. “Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification”. *FEMS microbiology reviews* 26, n° 3 (2002): 285–309.

Smith, J. L., E. A. Paul, J. M. Bollag, e G. Stotzky. “The significance of soil microbial biomass estimations”. *Soil biochemistry. Volume 6.*, 1990, 357–396.

Smith, L. C., C. A. M. deKlein, e W. D. Catto. “Effect of dicyandiamide applied in a granular form on nitrous oxide emissions from a grazed dairy pasture in Southland, New Zealand”. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 51, n° 4 (2008): 387–396.

Sogin, Mitchell L., Hilary G. Morrison, Julie A. Huber, David Mark Welch, Susan M. Huse, Phillip R. Neal, Jesus M. Arrieta, e Gerhard J. Herndl. “Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘rare biosphere’”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, n° 32 (2006): 12115–12120.

Sønstebo, J. H., L. Gielly, A. K. Brysting, R. Elven, M. Edwards, J. Haile, Eske Willerslev, E. Coissac, D. Rioux, e J. Sannier. “Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate”. *Molecular Ecology Resources* 10, n° 6 (2010): 1009–1018.

Stein, Lisa Y., e Martin G. Klotz. “The nitrogen cycle”. *Current Biology* 26, n° 3 (2016): R94–R98.

Suleiman, Afnan KA, Rogério Gonzatto, Celso Aita, Manoeli Lupatini, Rodrigo JS Jacques, Eiko E. Kuramae, Zaida I. Antonioli, e Luiz FW Roesch. “Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers”. *Soil Biology and Biochemistry* 97 (2016): 71–82.

Syakila, Alfi, e Carolien Kroeze. “The global nitrous oxide budget revisited”. *Greenhouse Gas Measurement and Management* 1, n° 1 (2011): 17–26.

Weng, Bosen, Xiangyu Xie, Jinjin Yang, Jingchun Liu, Haoliang Lu, e Chongling Yan. “Research on the nitrogen cycle in rhizosphere of *Kandelia obovata* under ammonium and nitrate addition”. *Marine pollution bulletin* 76, n° 1 (2013): 227–240.

Williams, Alwyn, Gunnar Börjesson, e Katarina Hedlund. “The effects of 55 years of different inorganic fertiliser regimes on soil properties and microbial community composition”. *Soil Biology and Biochemistry* 67 (2013): 41–46.

Wunsch, Patrick, Margitta Herb, Hagen Wieland, Ulrike M. Schiek, e Walter G. Zumft. “Requirements for CuA and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*”. *Journal of bacteriology* 185, n° 3 (2003): 887–896.

Zacherl, B., e A. Amberger. “Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*”. *Fertilizer Research* 22, n° 1 (1990): 37–44.

Zhang, Husen, John K. DiBaise, Andrea Zuccolo, Dave Kudrna, Michele Braidotti, Yeisoo Yu, Prathap Parameswaran, Michael D. Crowell, Rod Wing, e Bruce E. Rittmann. “Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, n° 7 (2009): 2365–2370.

Zhang, Qiu-Ling, Ying-Xu Chen, Ghulam Jilani, Imran Haider Shamsi, e Qiao-Gang Yu. “Model AVSWAT apropos of simulating non-point source pollution in Taihu lake basin”. *Journal of hazardous materials* 174, n° 1 (2010): 824–830.

Zumft, Walter G. “Cell biology and molecular basis of denitrification.” *Microbiology and molecular biology reviews* 61, n° 4 (1997): 533–616.