# Reacciones claves involucradas en el ciclo del nitrógeno y fosforo

El nitrógeno y el fosforo son uno de los elementos más significativos en los ecosistemas terrestres desde el punto de vista ecológico y económico, a demás, junto con el agua y el fósforo, es uno de los factores limitantes para el crecimiento vegetal y por ende la producción primaria y capacidad productiva de los ecosistemas ([Azcón-Bieto & Talón, 2000](#_ENREF_1), [Paul, 2007](#_ENREF_20)).

En gran medida la responsabilidad de la dinámica de este elemento en el suelo es por parte de los microorganismos quienes lo transforman en formas metabolizables para las plantas. Estas transformaciones involucran diversas enzimas que trabajan en forma secuencial organizadas y categorizadas en 5 etapas generales, a saber: Fijación, Mineralización, inmovilización, Nitrificación y Desnitrificación (**Figura 1-1**) a través de las cuales el nitrógeno toma nueve diferentes formas en el suelo, que corresponden a los diferentes estados oxidativos de este elemento, ([Kirchman, 2012](#_ENREF_11)).

La baja solubilización del fósforo en los suelos, lo hacen uno de los nutrientes limitantes para el crecimiento de las plantas, por lo tanto el uso de fertilizantes de fosfato son utilizados comúnmente, sin embargo, la producción de dichos fertilizantes se basa en procesamiento químico de fosfato mineral insoluble, lo cual resulta costoso y perjudicial para el medio ambiente. La solubilización del fosfato de roca fosfórica por microorganismos es una buena alternativa ([Whitelaw, 2000](#_ENREF_27)), sin embargo, el desarrollo en la agricultura de organismos capaces de facilitar la solubilización del fosfato como fertilizantes biológicos se ha iniciado con el estudio de la genética de microorganismos solubilizadores de fosfato. Algunos genes involucrados en solubilización mineral y orgánica han sido aislados y caracterizados, existe una gran expectativa sobre los logros que se puedan realizar a partir de estos estudios ([Rodríguez*, et al.*, 2006](#_ENREF_21)).

Para este estudio es esencial determinar las reacciones y enzimas relevantes de las diferentes etapas del ciclo del nitrógeno con el ánimo de rastrear el comportamiento general del ciclo, de acuerdo a los actores en la comunidad edáfica.

## Definición de reacciones relevantes para el ciclo del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso por medio del cual el nitrógeno atmosférico (N2) entra al suelo en forma de amoniaco (forma orgánica: NH3) ([Paul, 2007](#_ENREF_20)). Este proceso es exclusivo de ciertos procariotas, unos de vida libre y otros que viven en asociaciones simbióticas. Este proceso se lleva a cabo gracias al uso de la enzima nitrogenasa. Tres sistemas enzimáticos han sido descritos, la nitrogenasa de molibdeno (sistema *nif*), la nitrogenasa de vanadio (sistema *vnf*) y la nitrogenasa de hierro (sistema *anf*). Los tres sistemas de nitrogenasas son codificados por tres conjuntos de genes independientes (operones): *nif*HDK*, vnf*H más *vnf*DGK y *anf*HDGK ([Masepohl & Klipp, 1996](#_ENREF_16)). Sin embargo el mejor caracterizado es el *nif* (clasificado en la clase enzimática EC 1.18.6.1 y los otros sistemas son considerados alternativos, los cuales se expresan en condiciones de aerobiosis en microorganismos facultativos ([Noti*, et al.*, 1986](#_ENREF_18)), por lo tanto el estudio de estos sistemas alternativos proporciona un valor agregado al poder descriptivo de la comunidad desde el puto de vista de fijación del nitrógeno molecular.

La mayor proporción de nitrógeno del suelo se encuentra asociado a la materia orgánica, en forma de aminoácidos o proteínas y transformar estos compuestos a formas sencillas como amonio (NH3) es un proceso que se conoce como mineralización. Sin embargo, parte del NH3 liberado por los microorganismos es utilizado para su propio desarrollo, lo que implica la inmovilización de este elemento, así pues, la mineralización e inmovilización son procesos íntimamente relacionados y se dan simultáneamente en el suelo ([Kirchman, 2012](#_ENREF_11)). En primera instancia las enzimas proteolíticas actúan sobre las proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados hasta descomponerlas en sus componentes fundamentales, luego a éstos se les remueve el grupo amino (-NH2) a través de un proceso llamado deaminación, obteniendo como uno de los productos finales el amonio. Las peptidasas características de estos procesos son las metalloendopeptidasas (EC 3.4.24.-), serina endopeptidasas (EC 3.4.21.-) y aquellas enzimas que llevan a cabo la deaminación, representadas por las clases: oxidoreductasas deaminasas (EC 1.4.3.-), amonio liasas (EC 4.3.1.-), amino hidrolasas (EC 3.5.1) y nitrilo hidrolasas (EC 3.5.5.-) ([Bach & Munch, 2000](#_ENREF_2)). Sin embargo, nuestro enfoque no será la evaluación proteolítica del suelo, en consecuencia se eligieron como asunto de nuestro estudio aquellas enzimas encargadas de realizar los procesos de deaminación y que tengan como resultado final de la catálisis de aminoáciodos el amonio dada su importancia en el ciclo del nitrógeno (ver **Tabla 1-1:** ).

**Figura 1-1:** Subprocesos del ciclo del nitrógeno llevados a cabo por los microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, los micoorganismo usan el amonio para sí mismos como su fuente de nitrógeno. Para llevar a cabo este proceso metabólico, a partir del amonio los microorganismos utilizan al glutamato como intermediario en la biosíntesis de compuestos nitrogenados. La reacción de asimilación del amonio es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) codificada por el gen *gnl*A ubicado en el operon *gnl*ALG, sin embargo otros microorganismos pueden utilizar el amonio para la síntesis de glutamato usando la enzima glutamato dehidrogenasa (EC 1.4.1.(2 – 4) ) en aras del aprovechamiento del amonio también adquirido por fijación de nitrógeno ([Magasanik, 1982](#_ENREF_15), [Kanamori*, et al.*, 1989](#_ENREF_10)). Existe evidencia de que bajo condiciones limitantes de amonio o nitratos, los microorganismo exhiben un incremento en el uso del amonio vía glutamina sintetasa, no obstante, cuando existen limitaciones de carbono y exceso de nitrógeno inorgánico y amonio, los procesos asimilatorios se llevaban acabo en gran medida vía glutamato dehidrogenasa ([Nagatani*, et al.*, 1971](#_ENREF_17), [Brown & Dilworth, 1975](#_ENREF_5)), Así pues, se tuvieron en cuenta estas dos enzimas, con el ánimo de identificar si es posible algún estado de estrés al que esté sometida la comunidad.

Posteriormente ocurre el proceso de nitrificación, el cual comprende la conversión orgánica del amoniaco a formas inorgánicas, donde se realiza la transformación de amonio (NH4+) a nitrito (NO2-) y luego a nitrato (NO3-). Este proceso tiene gran importancia para la agricultura, puesto que es el causante principal de la perdida de nitrógeno en el suelo ([Subbarao*, et al.*, 2006](#_ENREF_25)). Presenta dos etapas realizadas por dos grupos diferentes de microorganismos (bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes). Los microorganismos oxidantes del amonio trabajan convirtiendo el amonio en hidroxilamina gracias a la enzima Amonio monooxigenasa (EC 1.14.99.39) (gen *amo*A que contiene el sitio activo) y la hidroxilamina en nitrito a través del gen *hao* ([Bergmann*, et al.*, 2005](#_ENREF_4), [Klotz & Stein, 2008](#_ENREF_12)). El nitrito resultante del proceso anterior es convertido a nitrato por organismos nitroxidantes con la ayuda de la enzima nitrito oxidasa, un complejo de membrana citocoromo bc codificado por los genes *nor*C y *nor*B ubicados en un clúster génico (EC 1.7.2.5) ([Suzuki*, et al.*, 2006](#_ENREF_26)). Para este trabajo se escogieron como relevantes las enzimas: AmoA como actor principal en el primer paso del proceso de nitrificación y por ser un poderoso marcador molecular con el cual se puede caracterizar las comunidades amonioxidantes ([Rotthauwe*, et al.*, 1997](#_ENREF_22)), por otro lado, se seleccionó el complejo nitrito oxidasa que involucra el último paso de la nitrificación y descriptor de la comunidad nitroxidante, abarcando de esta manera el principio y el fin de este proceso.

El siguiente proceso clave es la desnitrificación, mecanismo por el cual se devuelve a la atmósfera el nitrógeno atmosférico fijado (N2). La desnitrificación es la principal reacción para eliminar el exceso de nitratos en el suelo, compuestos que abundan por el uso de fertilizantes ntrogenados en la práctica agrícola. El óxido nítrico y óxido nitroso son productos intermedios en este proceso y tienen un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica, ya que intervienen en el calentamiento global y lluvia ácida ([Paul, 2007](#_ENREF_20)). La transformación de nitrato a nitrógeno molecular conlleva la formación de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N2O) como moléculas intermedias, transformación en la que intervienen los siguientes grupos enzimáticos: Las nitrato reductasas (Nar), nitrito reductasas (Nir), óxido nítrico reductasas (Nor) y oxido nitroso reductasas (Nos) ([Zumft, 1997](#_ENREF_29)).

Sin embargo, los microorganismos llevan a cabo la reducción del nitrato para tres fines: como fuente nitrógeno para su crecimiento (proceso asimilatorio), uso del poder reductor del nitrato para la obtención de energía (respiración) y para la disipación de este exceso de poder reductor en aras de optimizar el crecimiento en ciertas condiciones metabólicas (desasimilación). Tres tipos diferentes de enzimas nitrato reductasas están involucradas en estos procesos, a saber: nitrato reductasa citoplasmática asmimilatoria (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap) ([González*, et al.*, 2006](#_ENREF_8)).

Cuando se lleva a cabo la reducción asimilatoria del nitrato se da lugar a nitrito a través de la enzima Nas, el nitrito entonces se reduce posteriormente a amonio el cual vía glutamina sintetasa conlleva a la posterior formación de aminoácidos y proteínas. Existen dos tipos de enzimas nitrato reductasas asimilatorias: las NADH dependientes (EC 1.7.1.4) y ferredoxina o flavodoxina dependientes (EC 1.7.1.4). El primer grupo está constituido por dos subunidades codificadas por los genes *nas*A y *nas*C en el operón *nas*ABCDEF ([Ogawa*, et al.*, 1995](#_ENREF_19)), en el segundo grupo las enzimas están formadas por una única subunidad NasB que se co-transcribe con los genes de transporte del nitrato (operón *ntr*ABCD) ([González*, et al.*, 2006](#_ENREF_8)). El estudio de esta enzima permitirá caracterizar la población de acuerdo al uso de uno u otro grupo génico para llevar a cabo el proceso de asimilación.

La nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) está formada por tres subunidades α, β y γ, que corresponden a los genes *nar*G, *nar*H, *nar*I, codificados por el operón *nar*GHJI (configuración regular), sin embargo *E. coli* posee el operón *nar*ZYWV que codifica una Nar similar al producto del operón regular([González*, et al.*, 2006](#_ENREF_8)). Los cluster génicos NarG y NarZ se encuentran clasificados en la clase enzimática es la EC 1.7.99.4. Por otro lado, la enzima nitrato reductasa periplásmica (Nap) es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (NapA) y un citocromo c (NapB), codificadas por los genes *nap*A y *nap*B respectivamente ([González*, et al.*, 2006](#_ENREF_8)). Se ha identificado también otro citocromo con 4 grupos hemo codificado por el gen *nap*C el cual se encarga de transferir electrones al la proteína NapB. Estos genes se encuentran codificados en un operón y su clase enzimática es la EC 1.7.99.4. Se ha postulado que la dinámica de estas enzimas es complementaria dado que se ha identificado la presencia de enzimas Nar únicamente en condiciones de anaerobiosis; en contraste las enzimas Nap se expresan en condiciones de aerobiosis, a demás se ha demostrado que estas enzimas participan en la desnitrificación aeróbica y en los procesos de control del poder reductor intracelular en condiciones metabólicas como crecimiento fototrópico o con fuentes de carbono reducidas ([Sears*, et al.*, 2000](#_ENREF_23)). Dados estos antecedentes es importante rastrear estas dos enzimas por el valor que tiene para describir si el ecosistema se caracteriza por condiciones aerobias o anaerobias.

El nitrito proveniente de la reducción a través de las enzimas Nar es usado por las nitrito reductasas (Nir) para convertirlo en óxido nítrico. Existen dos tipos de Nir (EC 1.7.2.1) en la naturaleza, las que contienen un tetrahemo *cd*1 en el centro activo de la enzima NirS y las que contienen un cobre en el sitio activo (NirK) ([de Boer*, et al.*, 1994](#_ENREF_7)), los dos tipos de enzima no parecen tener ninguna relación estructural ni evolutiva ([Zumft, 1997](#_ENREF_29)). El gen *nir*K se ha encontrado localizado aislado en el genoma sin formar parte de ningún operón y sin genes relacionados con la desnitrificación próximos a el ([Zumft, 1997](#_ENREF_29)), en contraste las nitrito reductasa de tipo *cd*1 y su gen *nir*S forman parte de operones complejos, donde el número y organización de los genes *nir* difiere según las distintas especies ([de Boer*, et al.*, 1994](#_ENREF_7)). Dada sus diferencias en estructura génica es importante determinar la presencia de estos dos tipos de nitrito reductasas en las poblaciones microbianas presentes en el suelo, ya que pueden servir como elementos moleculares de diferenciación de la calidad entre distintos suelos, en relación con la forma como se asimila el nitrógeno.

El óxido nítrico (NO) producido en el paso anterior es una molécula citotóxica utilizada por los procariotas en la biosíntesis de toxinas, protección contra el daño oxidativo y como molécula reguladora del crecimiento, a demás, algunos microorganismos en condiciones de microaerobiosis pueden usar el NO como única fuente de energía ya que la reducción de NO a N2O está acoplada a la translocación de protones y por lo tanto síntesis de ATP ([Zumft, 2005](#_ENREF_28), [Crane*, et al.*, 2010](#_ENREF_6)). La reducción a óxido nitroso se lleva a cabo por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor). Se han identificado dos tipos de Nor en organismos desnitrificantes. Esta enzima está acoplada a una cadena de flujo de electrones y dependiendo de a quien se acople puede ser una enzima cNor, acoplada a un citocromo c o qNor, acoplada a una quinona ([Zumft, 2005](#_ENREF_28)). Las enzimas qNor consisten de una subunidad proteica NorB que comprende dos subunidades codificadas por los genes *nor*B1 o *nor*B y *nor*B2 conocida como *nor*Z ([Zumft, 2005](#_ENREF_28)). Las enzimas cNor están compuestas por dos subunidades, una con un citocromo c y la otra contiene un citocromo b y un átomo de hierro no hémico, llamadas NorC y NorB respectivamente. Los genes responsables de la síntesis de cNor están agrupados en el operón *nor*CBQD ([Bartnikas*, et al.*, 1997](#_ENREF_3)).

El último paso de la desnitrificación es la reducción de óxido nitroso (N2O) a dinitrógeno (N2), reacción catalizada por la enzima óxido nitroso reductasa (Nos). Los genes que codifican la enzima están organizados en operones cuya organización típica es *nos*RZDFYLX. La subunidad catalítica es codificada por *nos*Z ([Zumft, 1997](#_ENREF_29)). A causa de la importancia del NO es relevante hacer seguimiento de su dinámica en el proceso desnitrificante utilizando los dos tipos de enzimas Nor y la enzima Nos que llevan a cabo su reducción a nitrógeno molecular para ser devuelto a la atmósfera.

## Definición de reacciones relevantes para el ciclo del fosforo

La dinámica del fósforo (P) en el suelo está dada por los procesos de mineralización (inmovilización) microbiana, actividad vegetal y factores ambientales. Así pues en los suelos este elemento se encuentra fijado en forma de fosfatos de calcio, hierro y aluminio y es altamente proclive a formar compuestos inorgánicos inutilizables, ya que puede ser inmovilizado por materia orgánica o arcillas ([Paul, 2007](#_ENREF_20)). La fuente principal de este elemento son las rocas de apatita y depósitos de fosfato natural, liberado en una forma disponible para las plantas ([Paul, 2007](#_ENREF_20)). Plantas, animales y microorganismos constituyen la principal fuente de compuestos de fosforo orgánico, los cuales representan entre un 30-65% del total del fósforo orgánico en los suelos ([Lim*, et al.*, 2007](#_ENREF_14)), siendo en esencia los microorganismos que colonizan la rizósfera los encargados de excretar ácidos orgánicos y enzimas con actividad fosfatasa para incrementar la solubilidad del P a través de la hidrólisis de esteres de fosfato, a demás las asociaciones micorrízicas son críticas en la mediación de la disponibilidad del fosforo para un gran número de plantas ([Jones & Hinsinger, 2008](#_ENREF_9)). El fósforo en el suelo se encuentra entre un 15 – 80% en formas orgánicas (Po) cuyas principales formas son: los fosfatos de inositol, fosfolípidos y ácidos nucleicos ([Stevenson & Cole, 1999](#_ENREF_24)). La mineralización de éstos compuestos permite el reciclaje de este elemento y parte de este fósforo es absorbido por los organismos autótrofos en forma de HPO42- y de H2PO4- para construir ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres que son utilizados por heterótrofos en la cadena trófica (**Figura 1-2**), devueltos por estos últimos, incluyendo los descomponedores, en forma de fosfatos ([Lim*, et al.*, 2007](#_ENREF_13)).

Las moléculas que conforman el fosfato orgánico son diversas y por tanto su velocidad de mineralización es diferente, los ácidos nucleicos y fosfolípidos se mineralizan a gran velocidad en los suelos ([Lim*, et al.*, 2007](#_ENREF_14)), en la última etapa de la conversión del fosfato orgánico a inorgánico ocurre a través de la acción de la familia de enzimas fosfatasas, este grupo de enzimas es producido por entre el 70-80% de la población microbiana ([Stevenson & Cole, 1999](#_ENREF_24)), una vez el fosfato es mineralizado este puede ser tomado por las plantas, inmovilizado por la biomasa microbiana, precipitado en complejos inorgánicos o inmovilizado por arcillas y minerales del suelo. Sin embargo, otros compuestos como el myo-inositol-hexaquisfosfato no es fácilmente mineralizable y llega a acumularse en grandes cantidades, logrando constituir hasta el 80% del fosfato orgánico presente en los suelos ([Stevenson & Cole, 1999](#_ENREF_24)).

**Figura 1-2:** Mineralización del Fósforo y enzimas relacionadas.



Las enzimas anteriormente descritas (se resumen en la Tabla 1-1) permitirán determinar los estados de cada proceso clave del ciclo del nitrógeno en función tanto de las poblaciones microbianas que intervienen como la carga genética en términos de abundancia relativa las enzimas a rastrear. Con esta información de la comunidad edáfica

**Tabla 1-1:** Enzimas y genes claves de los 5 procesos fundamentales del ciclo del nitrógeno seleccionados para el estudio de la comunidad edáfica.



METODOLOGÍA

Para seleccionar los genes claves se llevó a cabo el siguiente flujo de trabajo:

1. Revisión bibliográfica para identificar los genes de enzimas claves involucrados en los diferente procesos del ciclo del nitrógeno
2. Almacenamiento local de la información concerniente a secuencias génicas, de aminoácidos y metadatos de tal manera que puedan ser utilizadas para el mapeo posterior sobre los metagenomas y/o metatranscriptomas.

## Almacenamiento local de los datos

La información clave desde el punto de vista de nutrición vegetal en ecosistemas agrícolas y naturales será almacenada siguiendo 5 niveles jerárquicos (**Figura 1-1**): Ciclos, Reacciones, Enzimas, Proteínas, Genes.

**Figura 1-1**: Modelo jerárquico de organización de la información para el almacenaje local.

Con el ánimo de consignar la información proteica de las enzimas reportadas como clave en los ciclos biogeoquímicos de N y P se realizó una búsqueda usando el número EC de cada enzima sobre la base de datos internacional Uniprot, descargando los archivos en formato plano de individuos procariotas y fungi. Para la actualización de las secuencias de proteínas y metadatos se creo una script en lenguaje Python (retrieveDNA), que lee el archivo de texto plano proveniente de Uniprot y recopila, mediante el protocolo SOAP, la información requerida usando las bases de datos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) .

Se obtuvo como resultado 23995 proteínas registradas a dichas enzimas con sus respectivas secuencias de ADN (**Tabla 1-3**).

**Tabla 1-3**: Número de proteínas registradas para cada enzima (número EC) clave y el respectivo porcentaje representado del total de proteínas descargadas. Estos registros son conforme a la actualización del 16 de Enero de 2016 la base de datos Uniprot.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Enzima (EC)** | **No. genes** | **% representado** |  | **Enzima (EC)** | **No. genes** | **% representado** |
| 1.14.99.39 | 80 | 0,333 |  | 3.5.1.3 | 5 | 0,021 |
| 1.18.6.1 | 2188 | 9,119 |  | 3.5.1.30 | 3 | 0,013 |
| 1.4.1.2 | 5 | 0,021 |  | 3.5.1.38 | 45 | 0,188 |
| 1.4.1.3 | 3 | 0,013 |  | 3.5.1.4 | 1043 | 4,347 |
| 1.4.1.4 | 22 | 0,092 |  | 3.5.1.44 | 946 | 3,942 |
| 1.4.3.1 | 53 | 0,221 |  | 3.5.1.6 | 74 | 0,308 |
| 1.4.3.16 | 1451 | 6,047 |  | 3.5.5.1 | 182 | 0,758 |
| 1.4.3.19 | 246 | 1,025 |  | 3.5.5.2 | 2 | 0,008 |
| 1.4.3.2 | 39 | 0,163 |  | 3.5.5.5 | 1 | 0,004 |
| 1.4.3.3 | 53 | 0,221 |  | 3.5.5.7 | 178 | 0,742 |
| 1.7.1.4 | 1463 | 6,097 |  | 4.3.1.17 | 2708 | 11,286 |
| 1.7.2.1 | 365 | 1,521 |  | 4.3.1.18 | 66 | 0,275 |
| 1.7.2.4 | 137 | 0,571 |  | 4.3.1.19 | 2416 | 10,069 |
| 1.7.2.5 | 134 | 0,558 |  | 4.3.1.23 | 7 | 0,029 |
| 1.7.7.1 | 200 | 0,834 |  | 4.3.1.24 | 2 | 0,008 |
| 1.7.99.4 | 4232 | 17,637 |  | 4.3.1.3 | 1739 | 7,247 |
| 3.5.1.1 | 1882 | 7,843 |  | 4.3.1.7 | 1229 | 5,122 |
| 3.5.1.19 | 696 | 2,901 |  | 6.3.1.2 | 100 | 0,417 |

De esta manera tenemos almacenada toda la información que hasta la fecha ha sido reportada para cada enzima.

**Bibliografía**

Azcón-Bieto J & Talón M (2000) *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGRAW-HILL, Madrid.

Bach HJ & Munch JC (2000) Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 219-224.

Bartnikas TB, Tosques IE, Laratta WP, Shi J & Shapleigh JP (1997) Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in Rhodobacter sphaeroides 2.4.3. *The Journal of Bacteriology* **179**: 3534-3540.

Bergmann DJ, Hooper AB & Klotz MG (2005) Structure and sequence conservation of hao cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: evidence for their evolutionary history. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5371-5382.

Brown CM & Dilworth MJ (1975) Ammonia Assimilation by Rhizobium Cultures and Bacteroids. *Microbiology* **86**: 39-48.

Crane BR, Sudhamsu J & Patel BA (2010) Bacterial Nitric Oxide Synthases. *Annual Review of Biochemistry* **79**: 445-470.

de Boer AP, Reijnders WN, Kuenen JG, Stouthamer AH & van Spanning RJ (1994) Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in Paracoccus denitrificans. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 111-127.

González PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD & Moura JJG (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**: 1015-1023.

Jones DL & Hinsinger P (2008) The rhizosphere: complex by design. *Plant and Soil* **312**: 1-6.

Kanamori K, Weiss RL & Roberts JD (1989) Ammonia assimilation pathways in nitrogen-fixing Clostridium kluyverii and Clostridium butyricum. *The Journal of Bacteriology* **171**: 2148-2154.

Kirchman DL (2012) *Processes in Microbial Ecology*. Oxford University Press, USA.

Klotz MG & Stein LY (2008) Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters* **278**: 146-156.

Lim BL, Yeung P, Cheng C & Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal*.

Lim BL, Yeung P, Cheng C & Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal* **1**: 321-330.

Magasanik B (1982) Genetic Control of Nitrogen Assimilation in Bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **16**: 135-168.

Masepohl B & Klipp W (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in Rhodobacter capsulatus. *Archives of Microbiology* **165**: 80-90.

Nagatani H, Shimizu M & Valentine RC (1971) The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology* **79**: 164-175.

Noti JD, Folkerts O & Turken AN (1986) Organization and characterization of genes essential for symbiotic nitrogen fixation from Bradyrhizobium japonicum I110. *Journal of Bacteriology* **167**: 774-783.

Ogawa K, Akagawa E, Yamane K, Sun ZW, LaCelle M, Zuber P & Nakano MM (1995) The nasB operon and nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in Bacillus subtilis. *The Journal of Bacteriology* **177**: 1409-1413.

Paul EA (2007) *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Elsevier Inc., Oxford.

Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T & Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* **287**: 15-21.

Rotthauwe JH, Witzel KP & Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4704-4712.

Sears HJ, Sawers G, Berks BC, Ferguson SJ & Richardson DJ (2000) Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (napEDABC) from Paracoccus pantotrophus in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology-Sgm* **146 ( Pt 11)**: 2977-2985.

Stevenson FJ & Cole MA (1999) *Cycles of soil*. John Wiley &amp; Sons Inc.

Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL*, et al.* (2006) Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 303-335.

Suzuki M, Arai H, Ishii M & Igarashi Y (2006) Gene structure and expression profile of cytochrome bc nitric oxide reductase from Hydrogenobacter thermophilus TK-6. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **70**: 1666-1671.

Whitelaw MA (2000) Growth Promotion Of Plants Inoculated With Phosphate-Solubilizing Fungi. *Advances in Agronomy* **69**: 99-151.

Zumft W (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**: 194-215.

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **61**: 533-616.