

Prix du meilleur
TFE agro

Les techniques -omiques et la bioinformatique dans les analyses environnementales

Comprendre les successions microbiennes du
cycle de l'azote du sol pour limiter les émissions
du gaz à effet de serre protoxyde d'azote à partir
des effluents d'élevage

VANESSA GELHAY

Stagiaire au CeREF Agronomique de Montignies-sur-Sambre

Étudiante en Master en alternance en génie analytique

à la Haute école Louvain-en-Hainaut (Mons)

vgelhay@yahoo.com

PROMOTEUR : JONATHAN SCAUFLAIRE

Section agro-industries et bio-technologies

Domaine agronomique

Campus de Montignies-sur-Sambre

Haute école Louvain-en-Hainaut

scauflairej@helha.be

RÉSUMÉ. – La Food and Agriculture Organization of the United Nations estime que pour répondre aux besoins alimentaires de l'humanité, il faudra 70 % de productions agricoles (végétales et animales) supplémentaires à ce qui est produit actuellement. Toutefois, il s'agit d'un secteur qui pèse lourd en termes d'émissions de gaz à effet de serre, qui participent au réchauffement climatique. Le protoxyde d'azote (N₂O), produit au champ et en étable à partir des efflu-

Licence : CC BY-NC-ND 2.0 BE

Diffusion autorisée — Pas de modification — Pas d'utilisation commerciale

ents d'élevage, est particulièrement problématique du fait de son pouvoir de réchauffement global plus important que celui du dioxyde de carbone. Il est donc indispensable d'avoir une bonne compréhension des successions microbiennes et des métabolismes des microorganismes du sol participant au cycle de l'azote, dont est issu le N_2O , pour pouvoir en limiter les effets. Les outils de la biologie moléculaire et la bioinformatique y joueront un rôle clé.

ABSTRACT. – The Food and Agriculture Organization of the United Nations has estimated that, in order to meet humankind's nutritional requirements, current agricultural production (plant and animal) would need to be increased by as much as 70 %. This sector, however, exacts a heavy toll on the environment in terms of greenhouse gas emissions, which contribute to global warming. Nitrous oxide (N_2O), produced by livestock in fields and barns, is particularly problematic due to the fact that its global warming potential (GWP) is higher than that of carbon dioxide. It is thus essential to have a solid grasp of the soil's microbial successions and the metabolism of microorganisms that form an integral part of the nitrogen cycle, which leads to the release of N_2O , in order to reduce its negative effects. Certain molecular biology and bioinformatics tools are to play a key role in this endeavour.

MOTS-CLÉS. – Agriculture — Bioinformatique — Élevage — Gaz à effet de serre — Métatranscriptomique

Plan de l'article

1. Introduction
2. La problématique des gaz à effet de serre résultant de l'activité agricole
 - 2.1. Définition de l'effet de serre
 - 2.2. Principaux gaz à effet de serre en agriculture et élevage
 - 2.3. Focus sur le cas du protoxyde d'azote
 - 2.3.1. Le protoxyde d'azote comme GES
 - 2.3.2. Cycle de l'azote dans le sol
 - 2.3.3. Voies de formation du protoxyde d'azote dans le sol
3. Les communautés microbiennes du sol
4. Importance de la biologie moléculaire et de la bioinformatique
 - 4.1. Définition des techniques -omiques et limitations
 - 4.2. Bioinformatique
5. Conclusions et perspectives

1. Introduction

Dans un rapport de 2009, la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) estimait que pour satisfaire les besoins alimentaires d'une population humaine de 9,1 milliards de personnes en 2050 (contre 7,9 milliards en 2021), il faudrait accroître les productions alimentaires de 70 % (FAO, 2009 ; Worldometer, 2021).

Au-delà des nombreux problèmes auxquels cette nécessité d'augmenter la production pourrait se heurter — manque de moyens financiers dans les pays

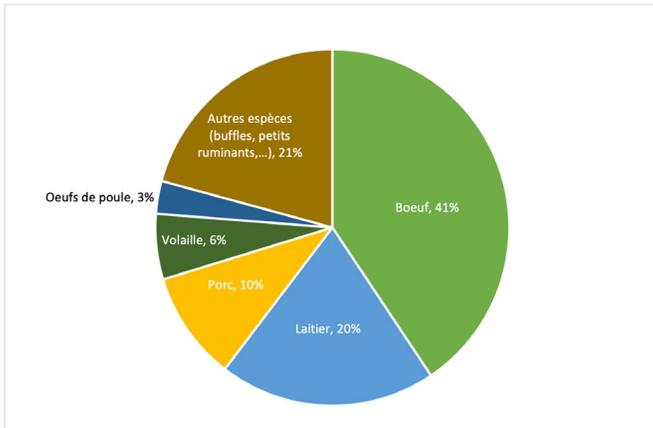
en développement, diminution des terres arables au profit de l'espace urbain, pour ne mentionner que ceux-là (FAO, 2009) —, l'agriculture et l'élevage constituent des sources importantes d'émissions de gaz à effet de serre. En effet, un rapport publié en 2020 par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) estime que 23 % des émissions totales de gaz à effet de serre (GES) d'origine anthropogène sont générées par les secteurs de l'agriculture, la foresterie et autres utilisations des terres (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2019). En particulier, le secteur de l'élevage représente à lui seul 14,5 % des émissions de GES (FAO, 2019).

À l'heure actuelle, nul ne peut ignorer l'urgence dans laquelle se trouve l'humanité pour développer des solutions de production pérennes si l'on souhaite éviter le désastre qu'une augmentation de la température mondiale à plus de 1,5°C par rapport à l'époque préindustrielle entraînerait (IPCC, 2014). Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes microbiens qui participent à la production de GES tels que le protoxyde d'azote (N_2O) à partir des déjections animales déposées au champ par le bétail devient indispensable pour pouvoir concevoir des solutions de mitigation. En effet, 30 à 50 % des émissions mondiales de N_2O liées à l'agriculture sont imputables aux effluents d'élevage (Oenema *et al.*, 2005), dégradés au champ par les communautés microbiennes intervenant dans le cycle de l'azote. L'évolution constante des techniques « -omiques » de la biologie moléculaire, ainsi que l'avènement de la bioinformatique, constituent des outils inestimables pour définir les successions microbiennes de ces communautés et développer des solutions qui permettront de limiter les émissions de N_2O liées aux effluents d'élevage.

2. La problématique des gaz à effet de serre liés à l'élevage

La production annuelle d'équivalent dioxyde de carbone¹ (équivalent CO_2) résultant des activités d'élevage d'animaux atteint 7,1 gigatonnes (Gt), dont la répartition en fonction du type d'élevage peut être visualisée dans le graphique n°1 qui permet de se rendre compte de l'impact de l'élevage bovin en particulier. En effet, pour obtenir 1 kg de protéines de bœuf, 342 kg d'équivalent CO_2 sont nécessaires (FAO, 2016), faisant de ce type d'élevage le plus coûteux en termes environnementaux (de Vries et de Boer, 2010).

1. L'équivalent CO_2 permet de « comparer les émissions de divers gaz à effet de serre sur la base de leur potentiel de réchauffement global (PRG), en convertissant les quantités des divers gaz émis en la quantité équivalente de dioxyde de carbone ayant le même potentiel de réchauffement planétaire » (Eurostat, non daté).



Graphique n°1.

Ce graphique représente la contribution (en %) du secteur mondial de l'élevage aux 7,1 gigatonnes (Gt) d'émissions de gaz à effet de serre (GES) liées au secteur l'agriculture, par type d'élevage. Ces 7,1 Gt correspondent, quant à elles, à 14,5 % des émissions de GES d'origine anthropique.

Source : mis en graphique d'après Gerber *et al.*, 2013.

2.1. Définition de l'effet de serre

L'effet de serre est un phénomène naturel qui permet de maintenir la température de notre planète à un niveau compatible avec la vie. En effet, les rayons du soleil sont absorbés par les surfaces terrestres telles que les sols et les océans, ce qui entraîne leur réchauffement. Les surfaces ainsi réchauffées émettent des rayons infrarouges en direction de l'espace. Ils rencontrent alors une couche de GES naturellement présents dans l'atmosphère, qui va réémettre une partie de ces rayons vers la surface de la Terre, y conservant ainsi une partie de la chaleur. Toutefois, les activités anthropiques ont considérablement accentué l'effet de serre, en relarguant d'énormes quantités de GES dans l'atmosphère, épaississant ainsi la couche de GES et retenant plus de rayons infrarouges au niveau terrestre (Department of Agriculture, Water and the Environment, non daté ; IPCC, 1990 ; NASA, non daté).

2.2. Principaux gaz à effet de serre en agriculture et élevage

On compte dix principaux GES : la vapeur d'eau (H_2O), le CO_2 , le méthane (CH_4), et le N_2O sont tous les quatre naturellement présents dans l'atmosphère, tandis que les perfluorocarbures (CF_6 , C_2F_6), les hydrofluorocarbures (CHF , CF_3CH_2F , CH_3CHF_2) et l'hexafluorure de soufre (SF_6) résultent exclusivement d'activités industrielles. Chacun de ces gaz est caractérisé

par une durée de vie atmosphérique et un pouvoir de réchauffement global (PRG). Ainsi, le N_2O mettra 121 ans avant d'être décomposé par des phénomènes chimiques naturels, et son PRG est de 265, soit 265 fois plus élevé que le PRG du CO_2 , qui sert de référence (Center for Sustainable Systems, University of Michigan, 2020).

L'enjeu est important pour les secteurs agricoles et de l'élevage. En effet,

1. la rumination et les déjections du bétail, et la culture du riz contribuent respectivement à 21% et 10% des émissions de CH_4 ;
2. les effluents d'élevage au champ et à l'étable représentent 23% des émissions de N_2O , tandis que l'utilisation de fertilisants azotés (minéraux et organiques, cultures intermédiaires pièges à nitrates) et la gestion des effluents participent à hauteur de 33 % à ces mêmes émissions (Olivier & Peters, 2020).

2.3. Focus sur le cas du protoxyde d'azote

2.3.1. Le protoxyde d'azote comme gaz à effet de serre

Si le N_2O fait partie des GES naturellement présents dans l'atmosphère, sa concentration ne cesse d'augmenter de 0,2-0,3 % chaque année (Badr & Probert, 1993). Ces auteurs expliquent que cette augmentation est problématique pour trois raisons :

1. Lorsqu'on compare le N_2O au méthane, il apparaît rapidement que le premier est beaucoup plus nocif que le second. En effet, le N_2O a une durée de vie atmosphérique de 121 ans, contre 12 ans pour le méthane, et un PRG de 265, contre 28 pour le méthane. Autrement dit, le N_2O persiste plus longtemps dans l'atmosphère et a un plus grand potentiel de réchauffement global que le méthane.
2. Le N_2O joue un rôle important dans la déplétion de la couche d'ozone; en effet, sa décomposition photochimique dans la stratosphère entraîne la formation de monoxyde d'azote (NO), qui catalyse les réactions de destruction de l'ozone.
3. L'oxydation de N_2O dans la stratosphère entraîne la formation d'acide nitrique (HNO_3), provoquant ainsi des pluies acides qui peuvent endommager la végétation et les bâtiments historiques, et perturber les écosystèmes d'eau douce.

Comme mentionné précédemment, la part de N_2O résultant des effluents d'élevage représente presque un quart des émissions totales de ce GES. En 2019, on comptait sur Terre plus de 1,5 milliard de bovins, près de 1,1 milliard de chèvres et plus de 1,2 milliard de moutons (FAOSTAT, 2019), soit un total de près de 3,8 milliards d'animaux² pour ces seuls types d'élevage. Certains pays, comme la Nouvelle-Zélande, comptent pratiquement autant de bovins (4,946 millions [DairyNZ, 2019]) que de population humaine (5,122 millions [StatsNZ, 2021]). En considérant que l'urine de bovin présente en moyenne une teneur en azote (N) de 700 kg par hectare (Haynes & Williams, 1993) et crée des patches d'urine de 0,34 à 40 m² (Oenema *et al.*, 1997; Moir *et al.*, 2011), on se rend vite compte que la quantité de N entrant dans le cycle de l'azote dans le sol est conséquente et, de ce fait, que le potentiel d'émission de N_2O par les bactéries du sol est également important.

2.3.2. Cycle de l'azote dans le sol

Ces dernières décennies, de nombreuses recherches ont mis l'accent sur l'importance de la compréhension du cycle de l'azote. En effet, si l'azote constitue un élément essentiel de l'agriculture (il entre dans la composition des protéines, nucléotides, et de la chlorophylle) en jouant un rôle crucial dans l'augmentation des rendements des cultures et dans l'amélioration de la qualité des productions, l'excès d'azote (sous forme de nitrates NO_3^-) aux champs peut entraîner des problèmes d'eutrophisation des milieux aquatiques et de pollution des nappes phréatiques.

Il existe plusieurs voies d'entrée dans le cycle de l'azote du sol, dont les effluents d'élevage font partie puisqu'ils apportent l'azote sous forme d'urée. Cette urée est rapidement hydrolysée en ammonium (NH_4^+), forme sous laquelle elle entre dans le cycle de l'azote. Classiquement, ce cycle est décrit comme un processus complexe qui transforme le diazote gazeux (N_2) en formes biologiquement valorisables (i.e. NH_4^+ , NO_3^-) par les microorganismes et les végétaux, et qui retourne dans l'atmosphère sous forme gazeuse. Il existe différentes voies de transformation, toutes dépendantes des conditions physico-chimiques du sol (e.g. concentration en oxygène, pH, température), et pouvant être séparées en deux catégories :

1. les voies biotiques, qui font intervenir des communautés microbiennes spécifiques, présentant des jeux d'enzymes qui leur sont propres;

2. La recherche a été effectuée sur la région « *World + (Total)* », l'élément « *Stocks* », l'item « *Live Animals > (List)* » et l'année « 2019 ».

2. les voies abiotiques, qui sont purement chimiques.

Dans cette description traditionnelle du cycle de l'azote, le N_2O est présenté comme le dernier intermédiaire avant la production de N_2 par nitrification autotrophe de *Nitrosomonas* sp. ou dénitrification hétérotrophe de *Pseudomonas* sp. Toutefois, Spott, Russow et Stange (2011) mentionnent plusieurs études mettant en évidence l'existence de nombreuses autres voies de formation de ces gaz, faisant intervenir d'autres communautés microbiennes et d'autres intermédiaires azotés que les traditionnels ammoniums, nitrates et nitrites (NO_2^-), ainsi que des voies abiotiques.

2.3.3. Voies de formation du protoxyde d'azote dans le sol

En ce qui concerne les voies abiotiques, elles peuvent dépendre de la présence d'éléments métalliques — dénitrification chimique, décomposition chimique de l'hydroxylamine NH_2OH (Zhu-Barker *et al.*, 2015) —, du pH — nitrosation abiotique (Spott, Russow & Stange, 2011) —, ou de la présence de lumière et de l'humidité relative — décomposition en surface du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (Rubasinghege *et al.*, 2011).

Pour ce qui est des voies biotiques de formation de N_2O , les principales sont la nitrification et la dénitrification. Chacune dépend de propriétés physico-chimiques particulières du sol (qui peuvent en faire varier la température, la concentration en oxygène, l'humidité...) et fait intervenir des espèces microbiennes spécifiques. Ainsi, la nitrification, qui permet l'oxydation de l'ammoniaque (NH_3) en nitrates, est réalisée en aérobiose, soit par des microorganismes chimiolithotrophes à partir d'ammoniaque et de nitrites, soit par des bactéries et champignons hétérotrophes à partir de composés organiques (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013; Highton, 2019). Quant à la dénitrification, il s'agit d'un procédé réducteur qui transforme les nitrates en N_2 , en passant nécessairement par la production de N_2O , dont la réduction en diazote est conditionnée par l'humidité et la température du sol, ainsi que la présence du gène de la réductase de N_2O (gène *NosZ*) chez le microorganisme (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013; Clough *et al.*, 2017). Contrairement à la nitrification, la dénitrification se produit en anaérobiose : ce sont les nitrates qui y jouent le rôle d'accepteurs d'électrons (Zumft, 1997). Toutefois, Hayatsu, Tago et Saito (2008) mentionnent des études du début des années 2000 ayant mis en évidence que certaines bactéries sont capables de dénitrifier en présence d'oxygène, bouleversant ainsi l'hypothèse dominante selon laquelle la dénitrification est un phénomène anaérobie.

Il existe d'autres voies biotiques que nous ne développerons pas ici, mais qui sont discutées dans de nombreuses études, car elles participent de façon significative aux émissions de N_2O à partir des sols (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013; Highton, 2019; Kool *et al.*, 2010; Laughlin & Stevens, 2002; Sanchez-Martin *et al.*, 2008; Rex *et al.*, 2018; Rex *et al.*, 2019; Streminska *et al.*, 2011; Utting *et al.*, 2011; Webster & Hopkins, 1996; Wrage *et al.*, 2004). Mentionnons simplement en exemple la codénitrification, qui produit des hybrides de N_2O et N_2 à partir de composés azotés nucléophiles tels que l'hydrazine (entre autres) et non à partir de nitrites libres (Clough *et al.*, 2017), et dans laquelle les champignons jouent un rôle prédominant.

3.2. Les communautés microbiennes du sol

Chaque sol est le fruit d'un long et complexe processus de formation faisant intervenir de nombreux paramètres, tels que les caractéristiques de la roche-mère, le climat, le relief, entre autres (Duchaufour, 1997; Jenny, 1941). Par conséquent, chaque sol est unique, et présente des caractéristiques physico-chimiques (pH, teneur en matière organique, salinité, texture, disponibilité en azote) qui lui sont propres et pouvant fortement varier, même à quelques centimètres de distance (Fierer, 2017; O'Brien *et al.*, 2016). Ces caractéristiques vont participer à la sélection des espèces microbiennes les plus adaptées à l'environnement du sol, en fonction de leurs exigences écologiques. Le tableau n°1 liste les microorganismes présents dans le sol, ainsi qu'une estimation de leur nombre et de leur biomasse dans le sol.

Microorganismes	Nombre/gramme (g) de sol	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	$10^8 - 10^9$	40 - 500
Actinomycètes	$10^7 - 10^8$	40 - 500
Champignons	$10^5 - 10^6$	100 - 1500
Algues	$10^4 - 10^5$	1 - 50
Protozoaires	$10^3 - 10^4$	Variable
Archées	$10^2 - 10^6$	4 - 50

Tableau n°1.

Nombre et biomasse relatifs des espèces microbiennes à une profondeur de 0-15 cm de sol.

Source : adapté de Hoorman & Islam, 2010 ; les valeurs relatives aux archées proviennent de Timonen & Bomberg, 2009, ainsi que de Bar-On, Philips & Milo, 2018.

Chaque catégorie d'organisme joue un rôle dans le sol. Ainsi, l'action des bactéries et champignons en tant que fournisseurs de substrats aux plantes et les services écosystémiques qu'ils rendent aux sols sont bien connus (Millard &

Singh, 2009), parmi lesquels compte la participation au cycle de l'azote. Nous nous concentrerons donc à présent sur les microorganismes qui y sont impliqués, à savoir les archées, les bactéries et les champignons.

Ce n'est qu'à la fin des années 1980 que les archées se sont vu attribuer leur propre domaine, aux côtés des domaines Bacteria et Eukaryota (Koonin, 2010). Ces procaryotes, réputés pour leur aptitude à résister à des environnements extrêmes, sont également présents dans les sols, comme l'a montré une étude de Morales, Jha et Sagar de 2015. Toutefois, la contribution des archées à la nitrification est moins marquée dans les sols que dans les écosystèmes marins (Hayatsu, Tago & Saito, 2008), et leurs propriétés dénitrifiantes n'ont pas encore été démontrées *in situ* (Cabello, Roldan & Moreno-Vivian, 2004).

En ce qui concerne les bactéries, elles occupent tous les habitats de notre planète, des sols terrestres aux planchers océaniques, et remplissent une multitude de fonctions, tant dans la nature — services écosystémiques (Tanner, 1985; Sahu *et al.*, 2017) — que dans les industries — production de molécules d'intérêt (Najafpour, 2007) — ou nos intestins — microbiote (Thursby & Juge, 2017). Dans les sols, les bactéries peuvent représenter jusqu'à 10% de la masse de matière organique (Sahu *et al.*, 2017) et interviennent, selon les genres, à différentes étapes du cycle de l'azote. Ainsi :

1. La fixation du diazote gazeux se fait grâce aux organismes libres du sol (e.g. *Azotobacter*), aux bactéries symbiotiques (e.g. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*), ou des bactéries formant des relations associatives avec les plantes (e.g. *Azospirillum*), qui convertissent N_2 en NH_3 grâce à l'enzyme nitrogénase (Wagner, 2011).
2. Interviennent ensuite les bactéries chimolithotrophes nitrifiantes, avec les genres *Nitrosomonas*, *Nitrospira* et *Nitrosococcus* (bactéries qui oxydent l'ammoniaque ou *ammonia-oxidizing bacteria*), et les genres *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrospira* et *Nitrococcus* (bactéries qui oxydent les nitrites ou *nitrite-oxidizing bacteria*), aboutissant à la formation de NO_3^- (Hayatsu, Tago & Saito, 2008). Quant aux bactéries hétérotrophes nitrifiantes, leur culture *in vitro* est très difficile (Ward, 2008), et seules quelques espèces ont été étudiées *in vitro*, telles que *Paracoccus denitrificans* (Moir *et al.*, 1996), *Alcaligenes faecalis* (Joo, Hirai & Shoda, 2005) et *Pseudomonas putida* (Daum *et al.*, 1998).
3. Les bactéries de la dénitrification présentent une certaine variabilité, puisque comme le décrivent Hayatsu, Tago et Saito (2008), certaines (e.g. *Paracoccus denitrificans*) sont capables de dénitrifier en présence

d'oxygène, alors que la dénitrification est généralement présentée comme étant une étape anaérobie; cette même bactérie est capable de consommer ou de produire N_2O , tandis que d'autres (e.g. *Agrobacterium tumefaciens*) ne peuvent que former N_2O ; enfin, les bactéries réductrices de N_2O non-dénitrifiantes constituent des puits à N_2O .

Quant aux champignons, il s'agit d'organismes eucaryotes unicellulaires (levures) ou pluricellulaires (moisissures) hétérotrophes, dont la contribution au cycle de l'azote s'évalue *in vitro* grâce à l'utilisation d'un inhibiteur fongique, le cycloheximide. Cette méthode a permis à Rex *et al.* (2017), entre autres, de montrer la part importante de N_2O liée à l'activité des champignons dans la codénitrification et la dénitrification, dont les flux en N_2O ont diminué de plus de 42% et 66% respectivement en présence de l'inhibiteur. Les champignons présentent un fort potentiel pour la production de N_2O : en effet, ils dominent souvent la biomasse microbienne des sols tempérés (Laughlin & Stevens, 2002), pouvant représenter de 12 à 95% de cette biomasse (Ruzicka *et al.*, 2000). De plus, ils ne possèdent pas l'enzyme permettant la réduction de N_2O en N_2 gazeux dans la dénitrification, et ils sont responsables de la production de N_2O par codénitrification dans les sols imbibés d'urée (Rex *et al.*, 2017), tels que les fameux patches d'urine laissés au champ par les animaux d'élevage.

Comme mentionné précédemment, la composition microbienne d'un sol varie fortement en fonction des caractéristiques physico-chimiques de celui-ci, du climat, du relief..., mais également d'autres facteurs comme les activités humaines. Il est par conséquent très compliqué de prédire la communauté microbienne d'un sol en particulier. Dans le cas des sols occupés pour l'élevage d'animaux s'ajoute une série de difficultés supplémentaires, causées notamment par les déjections urinaires des animaux. En effet, au-delà des effets sur les émissions de N_2O — l'urine entraîne une élévation localisée de pH favorisant la codénitrification à un pH proche de 7 (Clough *et al.*, 2017) et une zone localisée d'anoxie augmente la dénitrification (Liu *et al.*, 2019) —, les déjections urinaires entraînent des modifications persistantes dans la composition et la diversité de la communauté microbienne (Samad *et al.*, 2017). La compréhension des successions microbiennes dans le cycle de l'azote est donc indispensable pour pouvoir espérer un jour gérer les émissions de N_2O liées aux effluents d'élevage au champ.

4. Importance de la biologie moléculaire et de la bioinformatique

La présentation succincte des principaux acteurs du cycle de l'azote a permis de souligner l'énorme variabilité des espèces dans chacune des catégories discutées. L'identification d'un grand nombre de ces espèces par mise en culture *in vitro* sur des milieux plus ou moins spécifiques en fonction des caractéristiques recherchées est très difficile (voire impossible), car les conditions environnementales nécessaires à leur culture ne sont pas toujours réalisables en laboratoire. Or, si l'on souhaite pouvoir définir les successions microbiennes des différents intervenants à chaque étape du cycle de l'azote, il est indispensable de disposer de méthodes permettant une analyse non seulement des espèces présentes (métagénomique), mais plus précisément des espèces actives dans le sol à différents instants (métatranscriptomique, métabolomique). Le traitement des données issues de ces analyses -omiques nécessite un traitement bioinformatique pour pouvoir les interpréter. Ces deux secteurs (biologie moléculaire et bioinformatique) ont donc de beaux jours devant eux.

4.1. Définition des techniques -omiques et limitations

Par « techniques -omiques », l'article de Beale, Karpe et Ahmed (2016) entend :

1. la génomique, qui étudie le génome (acide désoxyribonucléique ou ADN) d'un organisme ;
2. la transcriptomique, qui se penche sur l'expression de ce génome via l'acide ribonucléique messenger (ARNm). Notons que les expressions « génomique » et « transcriptomique » peuvent être précédées d'un préfixe « méta- », auquel cas cela signifie que c'est l'ensemble des ADN et ARNm de tous les organismes présents dans un environnement qui seront étudiés ;
3. la protéomique, qui analyse l'ensemble des protéines d'une cellule, tissu ou organe ;
4. enfin, la métabolomique s'intéresse à l'ensemble des métabolites retrouvés au sein d'une cellule, tissu ou organe.

Chacune de ces techniques est caractérisée par un protocole et des exigences qui lui sont propres.

Dans le cadre d'études environnementales (par exemple, l'étude des communautés microbiennes du sol), le recours à la métagénomique et à la méta-transcriptomique semble tout indiqué afin de visualiser, dans le premier cas, quels organismes sont présents et quel est leur potentiel inscrit dans leur génome, et dans le second cas, l'activité microbienne en cours au moment du prélèvement. En effet, ce n'est pas parce qu'un organisme est présent et est potentiellement capable d'exprimer un gène intervenant dans le cycle de l'azote qu'il est véritablement actif dans ce cycle au moment où l'échantillon est prélevé.

Malgré les avancées incroyables que les techniques -omiques ont permises, Fierer (2017) explique que de nombreux défis doivent encore être relevés. Tout d'abord, ces techniques ne permettent pas de distinguer à quelles voies métaboliques les ADN et/ou ARNm identifiés participent, ce qui est problématique puisque dans le cas des émissions de N_2O , plusieurs voies de production existent. Elles ne permettent pas non plus d'identifier l'origine des acides nucléiques, qui peuvent être potentiellement issus d'organismes morts ou dormants. De plus, notre compréhension des relations entre la cinétique enzymatique, les conditions environnementales et les microorganismes est insuffisante pour pouvoir réaliser des prédictions, par exemple à propos des taux de dénitrification des sols. Enfin, des efforts restent à pourvoir pour assurer la fiabilité des résultats, en améliorant notamment la résolution taxonomique et les méthodes d'annotation de gènes en bioinformatique, et prédire l'abondance absolue des taxa grâce à la *Polymerase Chain Reaction* quantitative (q-PCR), là où les méthodes actuelles ne donnent qu'une idée de l'abondance relative en ciblant le gène 16S de l'ARN ribosomal (ARNr).

Signalons également qu'une partie de la communauté scientifique dispute la légitimité des espèces découvertes grâce à la métagénomique (Bisgaard *et al.*, 2019; Konstantidinis Rosselló-Móra & Amann, 2020), puisque selon le code international de nomenclature des procaryotes de Parker, Tindall et Garrity (2019), seuls les organismes vivant en culture peuvent servir à l'identification de nouvelles espèces.

4.2. Bioinformatique

L'avènement des techniques moléculaires a requis le développement de la bioinformatique afin de pouvoir traiter les énormes quantités de données générées. À titre d'exemple, la banque de données de séquences génétiques GenBank du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) comptait, en août 2021, 940.513.260.726 bases et 231.982.592 séquences (NCBI, 2021).

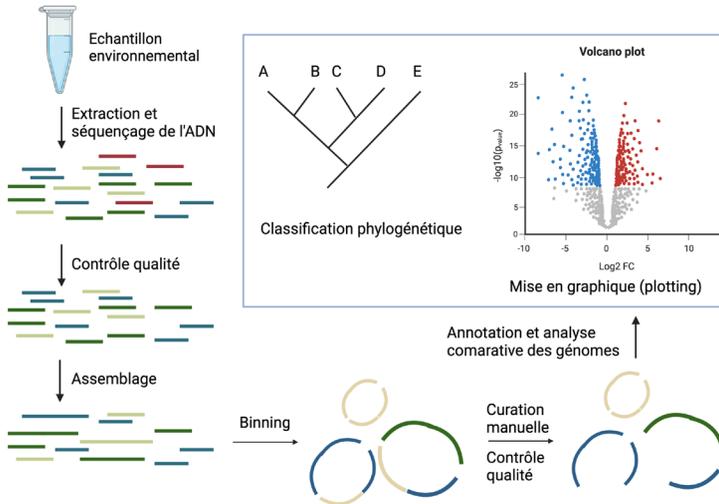


Figure n°1.

Schématisation simplifiée des étapes d'un pipeline de bioinformatique en métagénomique.

Chaque étape nécessite l'utilisation d'un programme spécifique. Après collection de l'échantillon, on en extrait l'ADN qui est ensuite séquençé soit en shotgun (amplification et séquençage de l'ensemble des organismes présents, peu importe leur règne taxonomique), soit en ciblant un règne spécifique (par exemple, en utilisant un gène ubiquitaire tel que le 16S ARNr des bactéries et archées). Le contrôle qualité sert à éliminer les séquences des adaptateurs, les séquences incomplètes...

Ensuite, les séquences d'un individu sont assemblées entre elles pour former des séquences plus longues, jusqu'à former le génome total de cet individu après binning. Cela permet d'assigner un taxon à l'individu, avant d'identifier, sur le génome, les gènes codant pour différentes protéines (annotation) ou de faire du traitement de données à l'aide de logiciels de biostatistiques (plotting).

Source : adapté par Gelhay (2020), d'après Zhang *et al.*, 2017, et créé avec BioRender.com.

La bioinformatique allie la connaissance des structures ou du séquençage des molécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN, les protéines et les métabolites, au pouvoir des outils informatiques (Gelhay, 2020). Son objectif principal est de comprendre ces données biologiques, évaluer comment elles peuvent s'imbriquer dans les résultats d'autres expériences, et construire des arbres phylogénétiques (Luscombe, Greenbaum & Gerstein, 2001). Concrètement, la bioinformatique traite les données brutes (e.g. séquences ADN), en éliminant les séquences des adaptateurs³, les séquences incomplètes, les

3. Les adaptateurs sont de courts oligonucléotides placés à l'extrémité des séquences d'intérêt pour permettre la fixation des amorces et ainsi l'amplification par PCR (Jiang *et al.*, 2014).

contaminants⁴... à l'aide de différents programmes informatiques, pour pouvoir identifier les individus et détecter certains *patterns* (regroupements de données, par exemple). Une schématisation du procédé se trouve en figure n°1.

Si la bioinformatique est devenue incontournable pour le traitement de données d'analyses moléculaires, un point faible potentiel est le grand nombre de programmes disponibles pour chacune des étapes de reconstitution des génomes, dont la qualité influence l'efficacité des algorithmes permettant l'assemblage des fragments (voir par exemple l'article de Forouzan *et al.*, 2018, pour une analyse de onze assembleurs *de novo*). Ces outils nécessitent donc d'être constamment évalués et améliorés pour garantir un résultat le plus précis et le plus proche de la réalité possible.

5.3. Conclusions et perspectives

Étant donné la croissance continue de la population humaine, les secteurs de l'agriculture et de l'élevage à des fins alimentaires n'auront d'autres choix que de continuer à produire davantage. Or, comme nous l'avons démontré, ces activités participent de manière conséquente aux émissions de GES contribuant au réchauffement climatique. En particulier, les effluents d'élevage au champ et en étable sont responsables de près d'un quart des émissions de N₂O liées aux activités anthropiques. Ce gaz à effet de serre ayant un pouvoir de réchauffement global et une durée de vie atmosphérique plus importants que ceux du méthane, il est crucial d'en limiter les émissions. Ainsi, l'Union européenne (UE) s'est fixé pour objectif, à l'horizon 2030, de réduire de 55 % ses émissions de GES (tous confondus) par rapport au niveau de 1990 (Commission européenne, 2020).

Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes microbiens et des conditions physico-chimiques du sol régissant les émissions de N₂O dans les prairies où paissent des animaux d'élevage constituera un outil potentiel puissant de régulation de ce GES. Les techniques de biologie moléculaire et la bioinformatique constitueront les meilleurs alliés des chercheurs en écologie moléculaire afin d'identifier chacun des acteurs impliqués dans le cycle de l'azote, ainsi que les étapes auxquelles ils participent, afin de révéler les points

4. Une séquence contaminante est définie par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) comme étant « une séquence qui ne représente pas fidèlement l'information génétique de la source biologique [...] car elle contient un ou plusieurs segments d'origine étrangère » (NCBI, 2012. Traduction de l'auteure). Par exemple, si le gène d'intérêt est un gène bactérien, une séquence contaminante serait une séquence d'un gène humain.

d'attention du procédé. En particulier, il paraît intéressant de maîtriser la dernière étape de la dénitrification, qui permet la réduction de N_2O en N_2 , en stimulant par exemple le développement des microorganismes qui y participent, voire en recourant à des champignons génétiquement modifiés pour exprimer la réductase de N_2O qui leur fait défaut.

Bibliographie

- Badr, O., & Probert, S.D. (1993). Environmental Impacts of Atmospheric Nitrous Oxide. *Applied Energy*, 44 (3), 197-231. doi : 10.1016/0306-2619(93)90018-K
- Bar-On, Y.M., Philips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (25), 6506-6511. doi : 10.1073/pnas.1711842115
- Beale, D.J., Karpe, A.V., & Ahmed, W. (2016). Beyond Metabolomics: A Review of Multi-Omics-Based Approaches. Dans Beale, D., Kouremenos, K., Palombo, E. (Eds), *Microbial Metabolomics* (pp. 289-312). Cham : Springer. doi: [10.1007/978-3-319-46326-1_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46326-1_10)
- Bisgaard, M., Christensen, H., Clermont, D., Dijkshoorn, L., Janda, J.M., Moore, E.R.B., Nemec, A., Nørskov-Lauritsen, N., Overmann, J., & Reubsæet, F.A.G. (2019). The Use of Genomic DNA Sequence as Type Material for Valid Publication of Bacterial Species Names Will Have Severe Implications for Clinical Microbiology and Related Disciplines. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 95 (1), 102-103. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.007
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E.M., Dannenmann, M., Kiese, R., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous Oxide Emissions from Soils: How Well Do We Understand the Processes and Their Controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1621), 20130122. doi: 10.1098/rstb.2013.0122
- Cabello, P., Roldan, M.D., & Moreno-Vivian, C. (2004). Nitrate Reduction and the Nitrogen Cycle in Archaea. *Microbiology*, 150, 3527-3546.
- Center for Sustainable Systems, University of Michigan (2020). *Greenhouse Gases Factsheet*. Pub. No. CSS05-21. Récupéré le 7 septembre 2021 de https://css.umich.edu/sites/default/files/Greenhouse%20Gases_CSS05-21_e2020.pdf
- Clough, T.J., Lanigan, G.J., de Klein, C.A.M., Samad, Md. S., Morales, S.E., Rex, D., Bakken, L.R., Johns, C., Condrón, L.M., Grant, J., & Richards, K.G. (2017). Influence of Soil Moisture on Codenitrification Fluxes from a Urea-affected Pasture Soil. *Scientific Reports*, 7 (1), 2185. doi: 10.1038/s41598-017-02278-y
- Commission européenne (2020). Communication de la Commission au parlement européen, au Conseil, au Comité économique et social européen et au Comité des régions. Accroître les ambitions de l'Europe en matière de climat pour 2030. Investir dans un avenir climatiquement. Récupéré le 9 septembre 2021

- de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CE-LEX:52020DC0562&from=EN>
- Dairy, N.Z. (2019). *New Zealand Dairy Statistics 2018-2019*. Récupéré le 7 septembre 2021 de https://www.dairynz.co.nz/media/5792471/nz_dairy_statistics_2018-19_web_v2.pdf
- Daum, M., Zimmer, W., Papen, H., Kloos, K., Nawrath, K., & Bothe, H. (1998). Physiological and Molecular Biological Characterization of Ammonia Oxidation of the Heterotrophic Nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 37(4), 281-288. doi: 10.1007/s002849900379
- de Vries, M., & de Boer, I. J. M. (2010). Comparing environmental impacts for livestock products: A review of life cycle assessments. *Livestock Science*, 128(1-3), 1-11. doi: 10.1016/j.livsci.2009.11.007
- Department of Agriculture, Water and the Environment (non daté). *Greenhouse effect*. Récupéré le 7 septembre 2021 de <https://www.environment.gov.au/climate-change/climate-science-data/climate-science/greenhouse-effect>
- Duchaufour, P. (1997). *Abrégé de pédologie. Sol, végétation, environnement* (5^e édition). Paris : Masson.
- Eurostat (non daté). *Glossaire : Équivalent dioxyde de carbone*. Récupéré le 6 septembre 2021 de https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Carbon_dioxide_equivalent/fr
- FAOSTAT (non daté). *Data: Crops and livestock products*. Récupéré le 7 septembre 2021 de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fierer, N. (2017). Embracing the Unknown: Disentangling the Complexities of the Soil Microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 579-590. doi: 10.1038/nrmicro.2017.87
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). *How to feed the world in 2050*. Récupéré le 1^{er} septembre 2021 de http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). *Livestock & Climate Change*. Récupéré le 6 septembre 2021 de <http://www.fao.org/3/i6345e/i6345e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). *FAO's work on climate change. United Nations Climate Change Conference 2019*. Récupéré le 3 septembre 2021 de <http://www.fao.org/3/ca7126en/ca7126en.pdf>
- Forouzan, E., Shariati, P., Maleki, M.S.M., & Karkhane, A.A. (2018). Practical Evaluation of 11 de novo Assemblers in Metagenome Assembly. *Journal of Microbiological Methods*, 151, 99-105. doi: 10.1016/j.mimet.2018.06.007
- Gelhay V. (2020). *A review of the role of omics-based techniques in identifying and understanding microbial successions in urine patches in New Zealand grasslands and their impact on N₂O emissions* (travail de fin d'études). Haute école Louvain-en-Hainaut, Montignies-sur-Sambre.

- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling Climate Change through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Rome, Italy : Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various Players in the Nitrogen Cycle: Diversity and Functions of the Microorganisms Involved in Nitrification and Denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 33-45. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x
- Haynes, R.J., & Williams, P.H. (1993). Nutrient Cycling and Soil Fertility in the Grazed Pasture Ecosystem. *Advances in Agronomy*, 49, 119-199. doi : 10.1016/S0065-2113(08)60794-4
- Highton, M.P. (2019). *Chemical and Microbial Determinants of N₂O Emission from Denitrification in Pasture Soils* (thèse de doctorat). University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- Hoorman, J.J., & Islam, R. (2010). Understanding Soil Microbes and Nutrient Recycling. Récupéré le 8 septembre 2021 de Ohionline. <https://ohionline.osu.edu/factsheet/SAG-16>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (1990). *Climate Change. The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge : University Press. Récupéré le 7 septembre 2021 de https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ipcc_far_wg_I_full_report.pdf
- Intergovernmental Panel on Climate Change (2019). *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems* [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (eds.)]. In press.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. Genève : IPCC. Récupéré le 24 septembre 2021 de https://archive.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_wcover.pdf
- Jenny, H. (1941). *Factors of Soil Formation: A System of Quantitative Pedology*. Michigan University : McGraw-Hill.
- Jiang, H., Lei, R., Ding, S-W., & Zhu, S. (2014). Skewer: A Fast and Accurate Adapter Trimmer for Next-generation Sequencing Paired-end Reads. *BMC Bioinformatics*, 15, 182. doi: 10.1186/1471-2105-15-182
- Joo, H.S., Hirai, M., & Shoda, M. (2005). Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 184-191. doi: 10.1263/jbb.100.184

- Konstantidinis, K.T., Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2020). Advantages Outweigh Concerns about Using Genome Sequence as type Material for Prokaryotic Taxonomy. *Environmental Microbiology*, 22 (3), 819-822. doi: [10.1111/1462-2920.14934](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14934)
- Kool, D.M., Wrage, N., Zechmeister-Boltenstern, S., Pfeiffer, M., Brus, D., Oenema, O., & Van Groeningen, J.W. (2010). Nitrifier Denitrification Can Be a Source of N₂O from Soil: A Revised Approach to the Dual-isotope Labelling Method. *European Journal of Soil Science*, 61, 759-772.
- Koonin, E. V. (2010). The Two Empires and Three Domains of Life in the Post-genomic Age. *Nature Education*, 3(9), 27. Récupéré le 8 septembre 2021 de Scitable by Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-two-empires-and-three-domains-of-14432998/>
- Laughlin, R.J., & Stevens, R.J. (2002). Evidence for Fungal Dominance of Denitrification and Codenitrification in a Grassland Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 66 (5), 1540-1548. doi: [10.2136/sssaj2002.1540](https://doi.org/10.2136/sssaj2002.1540)
- Liu, B., Zhang, X., Bakken, L.R., Snipen, L., & Frostegård, Å. (2019). Rapid Succession of Actively Transcribing Denitrifier Populations in Agricultural Soil During an Anoxic Spell. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12. doi: [10.3389/fmicb.2018.03208](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03208)
- Luscombe, N.M., Greenbaum, D., & Gerstein, M. (2001). What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods of Information in Medicine*, 40 (4), 346-358. doi: [10.1055/s-0038-1634431](https://doi.org/10.1055/s-0038-1634431)
- Millard, P., & Singh, B.K. (2010). Does Grassland vegetation Drive Soil Microbial Diversity? *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 88, 147-158. doi: [10.1007/s10705-009-9314-3](https://doi.org/10.1007/s10705-009-9314-3)
- Moir, J.W.B, Crossman, L.C., Spiro, S., & Richardson, D.J. (1996). The Purification of Ammonia Monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters*, 387 (1), 71-74. doi: [10.1016/0014-5793\(96\)00463-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00463-2)
- Moir, J.W.B, Cameron, K.C., Di, H.J., & Ferstak, U. (2011). The Spatial Coverage of Dairy Cattle Urine Patches in an Intensively Grazed Pasture System. *The Journal of Agricultural Science*, 149, 473-485. doi: [10.1017/S0021859610001012](https://doi.org/10.1017/S0021859610001012)
- Morales, S.E., Jha, N., & Saggarr, S. (2015). Biogeography and Biophysicochemical Traits Links N₂O Emissions, N₂O Potential and Microbial Communities across New Zealand Pasture Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 82, 87-98. doi: [10.1016/j.soilbio.2014.12.018](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.018)
- Najafpour, G.D. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology* (1^{re} édition), Elsevier Science. doi: [10.1016/B978-0-444-52845-2.X5000-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52845-2.X5000-9)
- NASA (non daté). *What is the greenhouse effect ?* Récupéré le 7 septembre 2021 de <https://climate.nasa.gov/faq/19/what-is-the-greenhouse-effect/>
- National Center for Biotechnology Information (2021). *GenBank and WGS Statistics*. Récupéré le 9 septembre 2021 de NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>

- O'Brien, S.L., Gibbons, S.M., Owens, S.M., Hampton-Marcell, J., Johnston, E.R., Jastrow, J.D., Gilbert, J.A., Meyer, F., & Antonopoulos, D.A. (2016). Spatial Scale Drives Patterns in Soil Bacterial Diversity. *Environmental Microbiology*, 18(6), 2039-2051. doi: [10.1111/1462-2920.13231](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13231)
- Oenema, O., Velthof, G.L., Yamulki, S., & Jarvis, S.C. (1997). Nitrous Oxide Emissions from Grazed Grassland. *Soil Use Management*, 13, 288-295.
- Oenema, O., Wrage, N., Velthof, G.L., van Groenigen, J.W., Dolfing, J., & Kuikman, P.J. (2005) Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 72, 51-65. doi : [10.1007/s10705-004-7354-2](https://doi.org/10.1007/s10705-004-7354-2)
- Olivier, J.G.J., & Peters, J.A.H.W. (2020). *Trends in global CO₂ and total greenhouse gas emissions : 2020 report*. La Hague : PBL Netherlands Environmental Assessment Agency.
- Parker, C.T., Tindall, B.J., & Garrity, G.M. (2019). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1A), S1-S111. doi: [10.1099/ijsem.0.000778](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778)
- Rex, D., Clough, T.J., Richards, K.G., de Klein, C.A.M, Morales, S.E., Samad, Md S., Grant, J., & Lanigan, G.J. (2017). Fungal and Bacterial Contributions to Codenitrification Emissions of N₂O and N₂ Following Urea Deposition to Soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(1), 135-149. doi: [10.1007/s10705-017-9901-7](https://doi.org/10.1007/s10705-017-9901-7)
- Rex, D., Clough, T.J., Richards, K.G., Condrón, L.M., de Klein, C.A.M, Morales, S.E., & Lanigan, G.J. (2019). Impact of Nitrogen Compounds on Fungal and Bacterial Contributions to Codenitrification in a Pasture Soil. *Scientific Reports*, 9(1), 13371. doi: [10.1038/s41598-019-49989-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-49989-y)
- Rubasinghege, G., Stanier, C.O., Carmichael, G.R., & Grassian, V.H. (2011). Abiotic Mechanism for the Formation of Atmospheric Nitrous Oxide from Ammonium Nitrate. *Environmental Science & Technology*, 45, 2691-2697.
- Ruzicka, S., Edgerton, D., Norman, M., & Hill, T. (2000). The Utility of Ergosterol as a Bioindicator of Fungi in Temperate Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 989-1005.
- Sahu, N., Vasu, D., Sahu, A., Lal, N., & Singh, S.K. (2017) Strengths of Microbes in Nutrient Cycling: A Key to Soil Health. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, 69-86. doi: [10.1007/978-981-10-5589-8_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5589-8_4)
- Samad, Md S., Johns, C., Richards, K.G., Lanigan, G.J., de Klein, C.A.M., Clough, T.J., & Morales, S.E. (2017). Response to Nitrogen Addition Reveals Metabolic and Ecological Strategies of Soil Bacteria. *Molecular Ecology*, 26(20), 5500-5514. doi: [10.1111/mec.14275](https://doi.org/10.1111/mec.14275)
- Sanchez-Martin, L., Vallejo, A., Dick, J., & Skiba, U.M. (2008). The Influence of Soluble Carbon and Fertilizer Nitrogen on Nitric Oxide and Nitrous Oxide Emissions from Two Contrasting Agricultural Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 142-151.

- Spott, O., Russow, R., & Stange, C.F. (2011). Formation of Hybrid N₂O and Hybrid N₂ Due to Codenitrification: First Review of a Barely Considered Process of Microbially Mediated N- nitrosation. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 1995-2011. doi: [10.1016/j.soilbio.2011.06.014](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.06.014)
- Stats N.Z. (2021). *Population*. Récupéré le 7 septembre 2021 de <https://www.stats.govt.nz/topics/population>
- Streminska, M.A., Felgate, H., Rowley, G., Richardson, D.J., & Baggs, E.M. (2011). Nitrite, Ammonium and Nitrous Oxide Production from Soil Isolates of Dissimilatory Nitrate Reducing Bacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 66-71. doi: [10.1111/j.1758-2229.2011.00302.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00302.x)
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836. doi: [10.1042/BCJ20160510](https://doi.org/10.1042/BCJ20160510)
- Timonen, S., & Bomberg, M. (2009). Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*, 8, 505-518. doi: [10.1007/s11101-009-9137-5](https://doi.org/10.1007/s11101-009-9137-5)
- Utting, T.R., Boeckx, P., Uller, C.M., & Klemetsson, L. (2011). Assessment of the Importance of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium for the Terrestrial Nitrogen Cycle. *Biogeosciences*, 8, 1779-1791.
- Ward, B.B. (2008). Nitrification in Marine Systems. Dans D.G. Capone, D.A. Bronk, M.R. Mulholland et E.J. Carpenter (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment* (2nd edition) (pp. 199-261). Elsevier.
- Wagner, S.C. (2011). *Biological Nitrogen Fixation*. Récupéré le 7 septembre 2021 de Nature Education Knowledge, <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>
- Webster, E.A., & Hopkins, D.W. (1996). Contributions from Different Microbial Processes to N₂O Emission from Soil under Different Moisture Regimes. *Biology and Fertility of Soils*, 22, 331-335.
- Worldometer (2021). *World Population*. Récupéré le 1^{er} septembre 2021 de <https://www.worldometers.info>
- Wrage, N., Velthof, G.L., Laanbroek, H.J., & Oenema, O. (2004). Nitrous Oxide Production in Grassland Soils: Assessing the Contribution of Nitrifier Denitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 229-236.
- Zhu-Barker, X., Cavazos, A.R., Ostrom, N.E., Horwath, W.R., & Glass, J.B. (2015). The Importance of Abiotic Reactions for Nitrous Oxide Production. *Biogeochemistry*, 126, 251-267.
- Zhang, Y., Kitajima, M., Whittle, A.J., & Liu, W.-T. (2017). Benefits of Genomic Insights and CRISPR-Cas Signatures to Monitor Potential Pathogens across Drinking Water Production and Distribution Systems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2036. doi: [10.3389/fmicb.2017.02036](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02036)
- Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533-616.