



Stratégie végétale d'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) : rôle dans l'amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes

William Galland

► To cite this version:

William Galland. Stratégie végétale d'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) : rôle dans l'amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes. Sciences agricoles. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1200 . tel-03384480

HAL Id: tel-03384480

<https://theses.hal.science/tel-03384480>

Submitted on 19 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°341
Écosystèmes Évolution Modélisation Microbiologie (E2M2)

Spécialité de doctorat : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 18/10/2019, par :
William Galland

Stratégie végétale d'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) : rôle dans l'amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes

Devant le jury composé de :

Moënné-Loccoz, Yvan, Professeur, Université Lyon 1
Achouak, Wafa, Directrice de Recherche, Université Aix-Marseille
Mench, Michel, Directeur de Recherche, INRA de Bordeaux
Chiapusio, Geneviève, Maître de Conférences, Université de Franche Comté
Maron, Pierre-Alain, Directeur de Recherche, INRA de Dijon
Haïchar, Feth-el-Zahar, Maître de Conférences, Université Lyon 1
Piola, Florence, Maître de Conférences, Université Lyon 1

Président du Jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tenais à remercier vivement la région Auvergne-Rhône-Alpes pour avoir financé cette thèse *via* une allocation doctorale de recherche en 2016 dans les disciplines santé et environnement, écotoxicologie.

Un grand merci aux membres de mon jury, d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit. Merci à Wafa Achouack et Michel Mench d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux, et merci à Geneviève Chiapusio, Pierre-Alain Maron, et Yvan Moënné-Loccoz d'endosser le rôle d'examineur. J'espère que ces travaux vous plairont.

Je commencerais ces remerciements par une phrase de Lilian qui pendant mon M2 à Bordeaux m'avait dit que la thèse était une joyeuse souffrance. Il avait raison, mais je ne pensais pas qu'un doctorat était un tel mélange d'émotions.

Tout comme les autres doctorants, en trois ans on passe assez vite de la colère et de l'anxiété à de l'excitation et de la joie ; mais, pour ma part, sans jamais baisser les bras et toujours voir la recherche du bon côté.

Ces trois années sont – je le pense – une expérience qui m'a aidé à me forger en tant que jeune homme que je suis. Ce manuscrit est à la fois une fierté et un espoir pour une future carrière qui, je l'espère, sera tout aussi riche en émotion.

Depuis le master, j'ai toujours su que je voulais faire une thèse, mais quelques fois la chance n'a pas été de cet avis. Et malgré tout, je ne remercierais jamais assez Florence et Zahar de m'avoir donné ma chance en me permettant de revenir dans ce laboratoire en tant qu'assistant-ingénieur et avoir cru en moi dès le départ en me prenant en thèse.

Ce sujet de thèse a été pour moi une chance car je l'ai vécu sans jamais le subir, j'y ai pris plaisir et je pense qu'il me l'a bien rendu.

Avant tout, je voudrais remercier du fond du cœur mes deux directrices. Je commencerais par ordre chronologique et donc par Florence avec qui j'ai commencé « la recherche » en M1. Je te remercie vraiment pour ta bonne humeur, ta disponibilité, tes conseils, pour m'avoir souvent aiguillé, pris beaucoup trop de fois en photo dans des moments improbables, et pour ces conversations scientifiques qui ont toujours été très enrichissantes.

Enfin Zahar, je te remercie très sincèrement pour ta disponibilité, ton côté maternel qui me manquera, ta franchise, tes expressions que je me suis mis à copier à la longue, ta façon de

travailler, ta gentillesse et tes petites attentions qui m'ont toujours beaucoup touché et donné le sourire.

Je vous remercie toutes les deux d'avoir été là pendant ces trois ans, d'avoir pris du temps pour moi, d'avoir toujours cru en moi et je suis fier de vous avoir eu comme directrices de thèse. C'était sincèrement un plaisir de travailler avec vous deux, vous me manquerez et j'espère retravailler avec vous dans le futur.

Cette thèse n'aurait peut-être pas eu la même direction sans les membres de mon comité de pilotage, qui ont été extrêmement bienveillants et de très bons conseils. Merci à Delphine, Olivier, Laurent et Erwan.

Puis au final, à tous les gens que j'ai croisé pendant ces années :

A la « famille » proche : Solène pour nos fous rires, ta franchise à Lisbonne, Lisbonne tout court, tes conseils au billard, nos moments potins, pour nos blagues un peu nulles et à notre petit bureau qui va vraiment me manquer.

Morgane pour avoir été la seule à ma taille pendant ce doctorat, on aurait aimé t'avoir au Mendel, puis aussi pour avoir eu le don de toujours tomber dans mes moments de stress mais avec le sourire et enfin au petit frère Théophile qui va se risquer sur *Arabidopsis* et qui va avoir la chef à 100 % dès janvier, va falloir assurer, mais ça je n'en doute pas une seconde !!

A toute l'équipe EVZH du LEHNA, même si j'ai été un peu le thésard fantôme, j'ai toujours pris un énorme plaisir à vous voir, c'était vraiment un plaisir de faire les repas de Noël avec vous, et je m'excuse d'être venu rarement, uniquement pour vous embaumer de mes odeurs de laitue ou céleri. Merci à tous pour votre bonne humeur, merci à Felix qui est l'une des personnes les plus gentilles que j'ai rencontré, merci beaucoup à Sara, Evelyne, Anne-Kristel, Sophie, Christelle, Christophe, Daniel, Hugo, Louise, Barbara, Melissa, Sofia, Soraya, Loreta, Frédéric, Marc et tous les autres.

Merci à Coralie dont j'ai suivi le cursus tout du long, à tes crises de jalousie parce que je ne répondais pas ou ne venais pas assez souvent, à nos moments de jugements intenses, à nos pauses et enfin pour m'avoir toujours écouté.

A la Serail, qui aura été au final mon troisième lieu de travail. Malgré ces voyages très matinaux en TCL pour m'y rendre, c'était toujours un plaisir de venir prendre une petite bouffée d'air et de sortir du labo. Je remercie donc toutes les personnes avec qui j'ai travaillé de près ou de loin là-bas : Céline et nos voyages un peu partout à l'été 2018 dans les exploitations de la région et sur son investissement dans le projet, à Alexandre pour sa gentillesse et sa

bienveillance, puis Antonin, Maxence, Lucille, Stéphane, Nans, Mathieu, Julien et les autres qui n'ont pas toujours compris ce que je faisais là chaque été.

Sonia, ça a été un plaisir de travailler avec toi, parfois speed, mais c'était très cool de bosser sur les champs avec toi, et de te croiser par-ci par-là. Je retiendrai surtout ta gentillesse et ta grande disponibilité.

A Mylène, pour avoir été son " chouchou " et nos sessions arrosages à la serre le vendredi soir avec Morgane.

Puis je voulais remercier mes deux stagiaires Mélisande et Lyna, qui ont été géniales.

Lyna j'ai peut-être un peu abusé en te demandant de m'envoyer un sms pour savoir si tu étais bien rentrée à chaque fois qu'on faisait du terrain, mais j'ai dû prendre la fibre maternelle de Zahar. Ça a été un plaisir de t'avoir en cette fin de thèse et j'espère que tu trouveras un poste qui te plait et plein de bonnes choses pour la suite.

Mélisande qui a été ma première stagiaire, j'espère ne pas avoir été trop maladroit dans mon encadrement.

Puis le bureau 418i, avec Laura et nos fous rires assez bizarres, son accent qui va sincèrement me manquer, mes « pétages de câbles » qu'elle a su contenir puis ceux qu'on a eu ensemble. Corinne, son sourire, sa gentillesse et parce que dans ce bureau je n'ai jamais été autant au courant de la vie secrète du laboratoire et ça c'était génial.

Catherine, pour sa bonne humeur, et nos nombreuses conversations matinales.

Jonathan qui a été une des plus belles rencontres de ce doctorat, à nos fous rires, ta disponibilité, à ton côté psy quand je venais en panique sur AME, à nos billards du midi, puis à tout ce qu'on fera encore ensemble après cette thèse.

David qui est un peu comme le grand frère au sein du labo, tes vannes et tout le reste me manqueront, je ne pourrai jamais re-imiter cette fameuse vidéo avec une autre personne que toi. J'espère que l'on se verra souvent pour que tu répondes à la nouvelle génération qui te demandera comment s'est passé ton weekend, que tu as fait des trucs avec un ancien thésard et que c'était le dawa !

Guillaume qui avec David ont été un peu mon afterfoot hebdomadaire, pour cette sortie dans fameux 5-1 qui me reste encore à travers la gorge, mais surtout pour ta bonne humeur et le plaisir de te rendre visite au CESN.

Puis au final, tous les gens du CESN, je n'y ai pas fait beaucoup de manip tout compte fait mais en tant qu'ancien phyto c'est un peu le lieu où il faut être, un lieu un peu en dehors du labo,

et avec une ambiance des plus agréable, alors merci à Marjo, à PE, à Dounia, à Benjamin, à Vincent, à Serge, à Isabelle et à Gilles.

Aux parties MPG avec Yoyo, Thib et PE, je n'ai pas souvent gagné mais ça été sympa de vous battre quelques fois.

A toutes les jeunes permanentes, Charline pour ta voix qui porte un peu trop, tes potins et nos fous rires, Laurène pour m'avoir fait découvrir qu'on pouvait trouver quelqu'un d'insupportable mais beaucoup l'apprécier à coté, Jeanne pour m'avoir toujours dit les choses franchement et m'avoir autant fait rire, Florence pour toutes ces chansons que j'ai eu dans la tête toutes ces semaines puis une petite pensée à Charlène, Cindy et Leslie.

Puis enfin mes collègues doctorants, Elodie parce que c'était une surprise et une joie de te retrouver après le master dans ce labo, à tous tes petits passages dans mon bureau qui me faisaient toujours énormément plaisir ; Lucas pour nos pauses toujours très intellectuelles et tes blagues ; Quentin pour ta bonne humeur, Jordan pour tes blagues, tes t-shirts, les billards et les soirées où je n'allais pas souvent ; Yohan pour t'avoir coupé les cheveux, m'avoir souvent énervé mais pas trop et pour nos débats sportifs ; à Cocote pour avoir découvert une très chouette personne, à nos fous rires ; à Dudu qui devait venir me voir soutenir 2020, au final j'ai été plus rapide et toi, tu es tout compte fait restée au labo ; à Antoine pour ton charisme, à Julien pour tes blagues ; à Guillaume pour m'avoir faire prendre l'accent du sud pour un certain film ; à Béa pour ton accent et tes blagues nulles ; à Mélanie pour me faire de moins en moins peur ; à Florian et Camille parce que vous êtes des phytos et parce que vous avez toujours le sourire ; à Sam pour avoir été le vrai représentant étudiant et pour les chouettes discussions qu'on a eu ; à Zazou ; à Lise , Rosa, Colin, Aurélie, Yoann, Xavier, Benjamin

A tous les stagiaires passés : Joris, Félicie, Cécile, Zélia, Pierrick, Clémence, Wilfried, Flavien, Théo, Sylvain, Kylian et j'en oublie sûrement.

Et à toutes les autres personnes du labo avec qui j'ai échangé, souri dans les couloirs, blagué, alors merci à Audrey, Danis, Daniel, Franck, Ludo, Céline, Amélie, Aless, Xavier, Pascale, Hasna, Aude, Maria, Petar, Philippe, Guillaume M, Patricia, Laurent, Claire V., Claire P.C., Laurence, Anne-Emmanuelle, Yvan, Geneviève, Sabine et Babeth.

Quel genre de doctorant je serais si je ne remerciais pas l'administration ? J'ai tout juste appris en trois ans à savoir le code UMR à inscrire sur un ordre de mission, mais que ça soit au LEM avec Betty, Dominique, Stéphane, Isabelle et Eric, ou au LEHNA avec Nadjat, Silvia et Nathalie vous avez été top !!

J'espère n'avoir oublié personne, mais au final c'était très agréable de travailler dans cet environnement, merci.

Puis je tenais quand même à remercier Nadège, Lilian et Michel qui m'ont donné ce goût pour la recherche et la vie en laboratoire.

Puis le doctorat ça n'a pas été que le labo, alors merci à Hugo et Yannis de m'avoir fait décompresser très souvent, désolé à Hugo de ne pas être venu en Suisse pendant ces trois ans. Yannis merci de m'avoir écouté pendant ces trajets interminables jusqu'à la presque-île. Merci à Laura et Nans pour m'avoir fait sortir du travail de nombreuses fois.

A Nolwenn, qui a supporté mes très nombreux moments de panique, mais aussi mes joies et mes projets, qui a toujours été là quand j'en avais besoin, merci d'avoir fait partie de ma thèse. Et pour finir à ma maman et Jean Luc, qui ont TOUJOURS été là pendant cette thèse, à me féliciter, à être fier de moi, à relire et écouter mes présentations sans tout comprendre, à m'avoir soutenu sans relâche et avoir cru en moi comme personne d'autre, je vous aime.

Je me doute que toutes les personnes citées ne liront pas ma thèse, mais ceux qui en auront le courage j'espère que vous apprécierez

RESUME

Pour répondre aux besoins des populations humaines, l'agriculture est de plus en plus intensive, utilisant un très grand nombre d'engrais azotés afin d'augmenter les rendements. Ces engrais sont utilisés parce que l'azote est l'un des facteurs les plus importants et limitants pour la croissance des plantes. L'azote sous forme de nitrate est soumis à des problématiques de pollutions pouvant affecter l'environnement ainsi que la santé humaine. Les défis de l'agriculture de demain sont donc de faire face à une population toujours plus nombreuse, tout en limitant l'impact sur notre environnement. C'est pour cela que la recherche et l'agriculture se questionnent de plus en plus sur l'utilisation d'autres produits comme les biostimulants ou des inhibiteurs, afin de limiter les intrants tout en conservant un taux de productivité viable.

Une solution consisterait à agir sur les microorganismes du sol liés au cycle de l'azote, afin de limiter les pertes des agrosystèmes en azote *via* le dégagement de gaz à effet de serre (N_2O), de lessivage ou/et de volatilisation.

En effet, dans les sols, le nitrate est également utilisé par les bactéries dites dénitrifiantes qui le réduisent en N_2O (gaz à effet de serre) et N_2 , représentant alors une perte d'azote pour les cultures et une augmentation de la pollution atmosphérique. Par conséquent, les plantes sont en compétition directe avec ces bactéries pour l'assimilation du nitrate. Récemment, l'équipe encadrante de cette thèse a mis en évidence une stratégie développée par certaines plantes consistant en la production de métabolites secondaires : les procyanidines, qui inhibent la dénitrification des communautés microbiennes du sol. Les procyanidines ont la capacité d'inhiber, chez les bactéries dénitrifiantes, la première étape de la dénitrification transformant le nitrate en nitrite et ainsi d'empêcher l'utilisation du nitrate, sans toutefois exercer un effet antibactérien. Cette stratégie permet de conserver par conséquent le nitrate dans le sol, celui-ci pouvant alors être utilisé par les plantes pour leur nutrition et leur croissance.

L'objectif principal de cette thèse a été d'évaluer l'effet de l'application de procyanidines exogènes à plusieurs concentrations en champs sur un modèle de plante d'intérêt économique, la laitue ; ainsi que sur différents types de sols. Ces effets ont également été testés sur un autre modèle d'intérêt économique consommateur d'azote, le céleri. Au cours de ces expérimentations, des mesures ont été effectuées sur (i) l'activité microbienne de

dénitrification, (ii) les traits végétaux en lien avec la croissance et (iii) l'abondance des communautés bactériennes dénitrifiantes.

Nos résultats montrent une induction d'un BDI en champs, une conservation du nitrate induisant à son tour une amélioration de la croissance des végétaux et une contre sélection par la plante des dénitrifiants.

L'autre point abordé, plutôt fondamental mais qui a moins abouti faute de temps, consistait à mettre en évidence *via* l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans la production des procyanidines ou surproduisant les procyanidines, un retour vers la plante de l'azote détourné suite au BDI

ABSTRACT

To meet the needs of human populations, agriculture is intensively increasing by using a very large number of nitrogen fertilizers to increase yields. These fertilizers are used because nitrogen is one of the most important and limiting factors for plant growth. Nitrate is the most form of nitrogen subjected to pollution problems that can affect the environment and human health. The challenges for tomorrow's agriculture are therefore to face an ever-increasing population, while limiting the impact on our environment. This is why research and agriculture are increasingly questioning the use of other products such as biostimulants or inhibitors, in order to limit fertilizer inputs while maintaining a viable productivity rate.

One solution would be to act on soil microorganisms linked to the nitrogen cycle in order to limit nitrogen losses from agrosystems through greenhouse gas emissions, leaching and/or volatilization.

Indeed, in soils, nitrate is also used by so-called denitrifying bacteria, which reduce it to N_2O (greenhouse gases) and N_2 , representing a loss of nitrogen for crops and an increase in air pollution. As a result, plants are directly in competition with these bacteria for the assimilation of nitrate. Recently, a strategy developed by some plants has been highlighted consisting on the production of secondary metabolites: procyanidins, which inhibit the denitrification process of microbial communities in soils. These molecules have the ability to inhibit the first step of denitrification in these bacteria that transform nitrate into nitrite and thus prevent their use of nitrate without killing them. This strategy could therefore make nitrate more available in the soil, which could be used by plants for their growth.

The main issue of this thesis was to test the effect of the application of exogenous procyanidins in field at several concentrations on economic interest crops such as lettuce. But also, their effects on lettuce crops on different types of soil and finally on a nitrogen-consuming crop such as celery. Tests were conducted on (i) microbial denitrification activity, (ii) plant traits related to growth and (iii) the abundance of denitrifying bacterial communities. Our results show an induction of a BDI in the fields, a conservation of nitrate inducing in turn an improvement of plant traits and a counter selection by the plant of denitrifiers.

TABLE DES MATIERES

Avant-Propos.....	7
--------------------------	----------

Synthèse bibliographie : Stratégie végétale d'acquisition de l'azote en interaction avec les microorganismes du sol : molécules, mécanismes et applications aux champs.....	9
--	----------

1. La révolution agricole et l'utilisation accrue d'engrais azotés.....	10
2. Les pollutions et risques liés aux nitrates.....	13
2.1. Lessivage et émissions de N ₂ O.....	13
2.2. Risques sur la santé humaine.....	16
3. L'azote du sol est soumis à plusieurs processus microbiens.....	18
3.1. Le cycle de l'azote dans l'environnement.....	18
3.1.1. La fixation du N ₂ atmosphérique.....	20
3.1.2. La nitrification.....	21
3.1.3. Oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox).....	22
3.1.4. La dénitrification.....	23
3.1.5. La minéralisation.....	24
4. Interaction plante- microorganisme : impact sur le cycle de l'azote.....	25
4.1. Interactions positives plantes-microorganismes du cycle de l'azote.....	25
4.1.1. La fixation biologique du N ₂	25
4.1.2. La stimulation de la minéralisation par les plantes.....	28
4.1.3. Les Plant Growth Promoting Bacteria améliorent l'assimilation de l'azote par les plantes	29
4.2. Interactions négatives plantes-microorganismes du cycle de l'azote.....	29
4.2.1. L'inhibition de la minéralisation.....	30
4.2.2. L'inhibition biologique de la nitrification.....	30
4.2.2.1. Mise en évidence du phénomène.....	30
4.2.2.2. Molécule impliquée.....	31
4.2.2.3. Mécanismes d'actions des brachialactones.....	31
4.2.2.4. Phénomène de BNI chez d'autres plantes.....	33
4.2.3. L'inhibition biologique de la dénitrification.....	34
4.2.3.1. Mise en évidence du phénomène.....	34
4.2.3.2. Molécule impliquée.....	34
4.2.3.3. Mécanismes d'actions des procyanidines.....	37
5. Applications de molécules en champs.....	40
5.1. Application des retardateurs de la nitrification.....	40
5.2. Application de biostimulant.....	41
5.3. Méthodes d'applications en champs des biostimulants.....	42
6. Conclusions et objectifs de la thèse.....	45

CHAPITRE 1. Démonstration d'un retour vers la plante de l'azote détourné suite au BDI avec le modèle *A. thaliana*.....47

1. Identification de la voie métabolique des procyanidines chez <i>A. thaliana</i> et sélection des mutants	49
2. Mise en évidence d'une production racinaire de procyanidines chez <i>A. thaliana</i>	51
3. Mise en évidence d'une réponse à un apport de procyanidines chez <i>A. thaliana</i>	54
4. Perspectives.....	58

CHAPITRE 2. Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) au champ : une stratégie pour améliorer la nutrition et la croissance des laitues.....61

Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: A strategy to improve plan nutrition and growth.....	65
--	----

Abstract.....	65
---------------	----

1. Introduction.....	65
2. Materials and methods.....	66
2.1. Plant growth and experimental design.....	66
2.2. Measurement of lettuce traits.....	66
2.2.1. Measurement of lettuce mass, specific leaf area (SLA) and flavonoid levels in leaves.....	66
2.2.2. Leaf mechanical properties.....	66
2.3. Plant N content.....	66
2.4. Denitrification enzyme activity (DEA).....	66
2.5. Nitrate concentrations in soil.....	67
2.6. Effect of procyanidins on the <i>NarG</i> of nitrate reducing bacteria.....	67
2.7. Quantification of total bacteria and denitrifier abundance.....	67
2.8. Root development of lettuce seedlings on Knop agar.....	67
2.9. Data and statistical analyses.....	67
3. Results	68
3.1. Denitrification activity and biological denitrification inhibition.....	68
3.2. Effect of procyanidins on <i>Narg</i> of nitrate reducing bacteria.....	68
3.3. Abundance of total and denitrifying bacteria.....	68
3.4. Effect of soil procyanidin addition to soil on nitrate concentrations.....	68
3.5. Effect of procyanidin addition on lettuce traits.....	68
3.6. Nitrogen concentration in plants.....	69
3.7. Effect of procyanidins on root development in vitro.....	69
4. Discussion.....	69
4.1. The addition of procyanidins under field conditions causes BDI and changes in denitrifier abundance.....	69

4.2. The addition of procyanidins in the field modifies the soil nitrate concentration and increases lettuce growth.....	71
5. Conclusion.....	72
Acknowledgements	72
References.	72

CHAPITRE 3. Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) en champs : effet sur la croissance de la laitue dans deux types de sols différents.....75

Biological inhibition of denitrification (BDI) in the field : effect on plant growth in two different soils	79
Abstract	79
Introduction.	80
Materials and methods.....	82
Plant growth and experimental design.....	82
Denitrification Enzyme Activity (DEA).....	83
Quantification of total bacterial and denitrifier abundance.....	83
Nitrate concentrations in soil.....	83
Measurement of lettuce mass.....	83
Leaf mechanical properties.....	84
Plant N content.....	84
Soil porosity measurement.....	84
Data and statistical analyses.....	85
Results.....	86
Biological denitrification inhibition.....	86
Abundance of total bacterial and denitrifier communities.....	87
Effect of procyanidin addition to soil on nitrate concentrations.....	88
Effect of procyanidin addition on lettuce traits.....	90
Nitrogen concentration in plants.....	91
Effect of procyanidins addition on soil porosities.....	92
Discussion	93
The addition of procyanidins induces BDI in soils of both textures.....	93
The addition of procyanidins induces nitrate conversation and an increase in lettuce morphological traits for both soil textures.....	95
The addition of procyanidins did not induce a change in soil structure.....	96
Acknowledgements	97
References.	97

CHAPITRE 4 : L'inhibition biologique de dénitrification (BDI) appliquée au champ induit-elle une augmentation de la croissance et de la nutrition d'une espèce végétale à croissance longue : *Apium graveolens* L. ?.....101

Does biological denitrification inhibition (BDI) in the field induce an increase in plant growth and nutrition for the plant species <i>Apium graveolens</i> L. grown for a long period?.....	105
Abstract	105
1. Introduction.....	106
2. Materials and methods.....	109
2.1. Plant growth and experimental design.....	109
2.2. Denitrification Enzyme Activity (DEA).....	110
2.3. Quantification of total bacteria and denitrifier abundance.....	110
2.4. Nitrate concentrations in soil.....	110
2.5. Measurement of celery traits.....	111
2.6. Plant N content.....	111
2.7. Colorimetric measurement of nitrogen stress.....	111
2.8. Data and statistical analyses.....	111
3. Results.....	112
3.1 Biological denitrification inhibition.....	112
3.2. Abundance of total and denitrifying bacterial communities.....	113
3.3. Effect of amendments on soil nitrate content.....	114
3.4. Effect of amendments on celery traits.....	116
3.5. Effect of amendments on plant N content.....	118
3.6. Effect on amendments in colorimetric measurements of N stress.....	119
4. Discussion.....	121
4.1. Procyanidin amendment to celery plots induced an increase in BDI.....	121
4.2. The addition of procyanidins to the plots induced an improvement in celery morphological traits.....	123
5. Conclusion.....	126
Acknowledgements	126
References	127

DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....131

1. Application au champ des procyanidines, intérêts agricole et économiques.....	132
1.1. L'application de procyanidines en champs induit un BDI augmentant la productivité végétale	132
1.2. La qualité des cultures n'est pas modifiée par un amendement en procyanidines.....	134
1.3. Affiner les méthodes d'applications des procyanidines.....	135
2. Mieux comprendre les mécanismes du BDI.....	136
2.1. Le phénomène du BDI peut-il être dû à d'autres métabolites secondaires.....	136

2.2. Comment les plantes réagissent-elles au BDI ?.....	137
2.3. Comment les bactéries dénitrifiantes réagissent-elles aux procyanidines ?.....	138
Conclusion	141
Références	142

AVANT PROPOS

C'est en essayant de comprendre le pouvoir invasif de la renoué du Japon et pourquoi les sols, sous l'influence de cette plante, avaient une réduction significative de la dénitrification par rapport à des sols hors influence de la renouée ([Dassonville et al. 2011](#)) que la stratégie végétale de l'inhibition biologique de la dénitrification (BDI) a été mise en évidence (Thèse C. Bardon). Cette stratégie consiste en la production au niveau racinaire de métabolites secondaires du nom de procyanidines, capables d'inhiber l'activité de dénitrification des communautés microbiennes du sol. Ces communautés étant en compétition avec les plantes pour le nitrate, le BDI permet de rendre disponible davantage cet élément essentiel pour la croissance des plantes.

La question qui s'est alors posée était de savoir si ce nitrate conservé dans le sol suite au BDI était utilisé par la plante pour sa nutrition et sa croissance. Durant la thèse de C. Bardon, il n'a pas été démontré clairement si ce nitrate était utile pour la croissance des plantes. Ma thèse propose de répondre à cette question.

Financée par la région Auvergne-Rhône-Alpes avec une allocation doctorale de recherche ARC environnement, cette thèse a pour but **de démontrer et tester en *in planta* et au champ le retour à la plante du nitrate détourné suite au mécanisme de l'inhibition biologique de la dénitrification.**

Ce projet s'est divisé en deux parties : (1) une **partie fondamentale** où nous avons essayé de démontrer et comprendre le retour de ce nitrate en utilisant le modèle *Arabidopsis thaliana* et ses mutants non producteurs de procyanidines, et (2) une **partie en champs** afin de transposer la stratégie végétale du BDI (à la station expérimentale la Serail et des champs d'agriculteurs partenaires).

Ce manuscrit commencera par une synthèse bibliographique traitant des stratégies végétales d'acquisition de l'azote en interaction avec les microorganismes du sol: molécules, mécanismes et applications en champs. Puis les chapitres suivants relateront dans l'ordre (1) des essais relatifs à une démonstration d'un retour de l'azote détourné suite à la stratégie du BDI sur le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*, (2) du premier essai en champs sur l'effet de l'application de procyanidines sur la productivité d'une culture de laitue, (3) d'un essai réalisé sur plusieurs sols cultivés de laitues afin de déterminer si l'application de procyanidines est réalisable sur d'autres types de sols puis (4) un essai sur l'effet des procyanidines et donc du

BDI sur une culture longue et consommatrice d'azote comme le céleri. Ce manuscrit se conclura par une discussion générale faisant la synthèse de toutes les conclusions, hypothèses et perspectives avancées durant ces chapitres.

**Stratégie végétale d'acquisition de l'azote en
interaction avec les microorganismes du sol :
molécules, mécanismes et applications aux champs.**

1. La révolution agricole et l'utilisation accrue d'engrais azotés

Au début du XX^{ème} siècle, l'agriculture avait atteint des niveaux relativement inégaux en termes d'équipements, de techniques et de rendements, allant de l'agriculture manuelle à l'agriculture à tractions animales et mécanisées plus performante ([Federico, 2010](#)). Ce développement inégal s'est accompagné d'une augmentation démographique importante, où la population humaine, d'après l'Organisation des Nations Unies (ONU), avait augmenté d'un milliard d'individus dans la première moitié du XX^{ème} siècle. Dans le but d'accompagner cet essor, d'éviter la malnutrition de la population, et éventuellement d'induire de grosses pauvretés et famines dans les régions les moins développées du monde, des solutions ont été trouvées ([Runge and Runge, 2010](#)).

Une des premières méthodes pour augmenter l'efficacité des cultures fut de faire des rotations culturales afin de ne pas appauvrir le sol de façon répétée ([Bullock, 1992](#)). En effet, des cultures différentes n'ont pas la même profondeur d'enracinement et consomment différemment les ressources du sol d'une espèce à l'autre ([West and Post, 2002](#)). De plus, les différentes espèces mises en rotation laissent des racines qui représenteront alors une source nutritive pour la culture suivante ([Havlin et al., 1990](#)). Ces solutions ont longtemps représenté une solution pour maintenir une productivité importante dans les exploitations agricoles.

Au début des années 1960, l'agriculture, pour répondre à ces problématiques, a connu un véritable élan avec la démocratisation des tracteurs mécaniques ([Bowers, 1992](#)), de la recherche et production de semences à fort rendement ([Yapa, 1993](#)), de l'utilisation progressive de produits phytosanitaires ([Tilman et al., 2002](#)) et surtout avec la production à grande échelle d'engrais chimiques plus économiques ([Hignett, 1985](#)). Toutes ces techniques ont permis d'améliorer très efficacement les rendements des productions agricoles à travers le monde et d'instaurer une véritable révolution agricole ayant même le nom de « révolution verte » dans les pays en développement ([Evenson and Gollin, 2003](#)).

Parmi les engrais issus de cette nouvelle industrie, ceux à base d'azote sont les plus importants économiquement et pour les cultures ([Matson et al., 1998](#)), car l'azote est un des éléments les plus importants mais aussi les plus limitant pour la croissance des plantes, qui le consomment essentiellement sous deux formes : l'ammonium (NH_4^+) et/ou le nitrate (NO_3^-) ([Bloom, 2015](#); [Ronen, 2016](#)). L'innovation majeure en termes d'apports azotés a été l'industrialisation de la production de ceux-ci, industrie qui consiste ici à oxyder l'ammoniac de l'atmosphère (NH_3) par combustion puis à absorber dans l'eau le dioxyde d'azote (NO_2)

formé pour obtenir l'acide nitrique (HNO_3). La réaction directe entre l'ammoniac et l'acide nitrique conduit à la formation de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) qui après granulation et addition d'une matière de charge (pour stabiliser le produit et le rendre moins hygroscopique), permet de fabriquer les ammonitrates (Kiiski, 2009). Ces derniers sont les engrais minéraux azotés les plus utilisés dans l'agriculture et existent essentiellement sous deux formes : l'ammonitrate 33,5 % (AN) contenant de l'azote sous forme d'ion ammonium (NH_4^+) et d'ions nitrates (NO_3^-) à parts égales et l'ammonitrate 27 % (CAN) contenant en plus de la dolomie ou du carbonate de calcium (Kiiski, 2009). L'ammonitrate est préféré à l'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) car celui-ci est moins absorbé par la plante et représente une perte plus importante par volatilisation. De plus, l'ammonitrate est produit plus efficacement dans l'industrie (Gould et al., 1986; Gezgin and Bayraklı, 1995; Stewart et al., 2005)

Selon une étude de 2017 de la FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations), l'utilisation annuelle d'engrais azotés dans le monde est passée de 89 millions de tonnes en 2005 à 110 millions de tonnes en 2016 et devrait, d'après les prévisions, augmenter de 1,4 % par an sur la décennie à venir. Bien que les prévisions soient plutôt à une baisse de ces intrants en France en raison d'une prise de conscience écologique, l'utilisation des engrais azotés est passée de 205 000 tonnes par an en 1950 à plus de 2,2 millions de tonnes par an en 2016 (FAO), ce qui traduit une utilisation très conséquente d'intrants dans les agrosystèmes français (Figure 1).

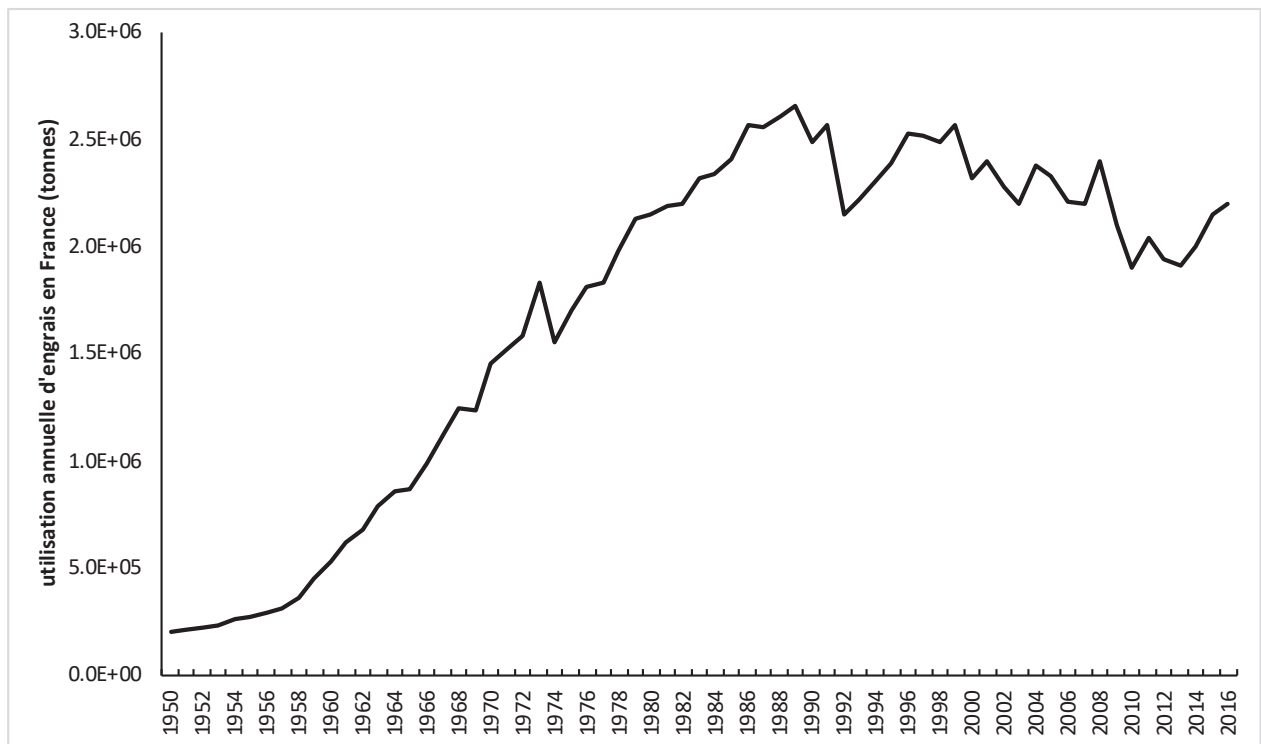


Figure 1 : Évolution annuelle de 1950 à 2016 de la consommation par an d'engrais azotés par tonnes au niveau des agrosystèmes Français. (d'après FAO).

Cette utilisation massive est due au fait que bien que la population augmente, la surface des terres arables augmente moins vite et a tendance à stagner depuis près d'une décennie comme le montre les sources de la FAO. L'activité microbienne du sol transforme, par minéralisation, l'azote organique et ammoniacal en nitrates et représente ainsi la principale source naturelle d'azote pour les plantes (Morot-Gaudry, 1997). Ainsi, la solution du sol contient normalement des concentrations élevées en nitrates (100 à 250 mg de NO_3^- par litre), mais la succession de cultures ne permet pas de renouveler les concentrations naturelles nécessaires dans le sol et c'est pour cela entre autres que les agriculteurs ajoutent des engrais dans le sol. Ceci traduit donc une utilisation intensive des sols agricoles (Tilman et al., 2002), où l'on cherche sur les mêmes surfaces à produire plus, plus vite et moins cher (Boserup, 2017). L'utilisation excessive d'intrants azotés en agriculture provoque différents problèmes au niveau des écosystèmes. Dans un premier temps, la plupart de ces engrais ne sont pas absorbés par les cultures, soit par limitation du métabolisme des plantes de cultures soit par un excès d'ajout par les agriculteurs (Cassman et al., 2002). Les engrais peuvent, de même, être soit lessivés dans les sols ce qui représente une perte d'azote pouvant aller jusqu'à 20 %, soit être volatilisés en NH_3 suite à l'acidification du sol exacerbée d'ailleurs par

l'application d'engrais et ainsi représenter une perte d'azote dans les systèmes agricoles pouvant aller jusqu'à 21 % (Bouwman et al., 2002). De plus, l'azote dans les sols est aussi consommé par des microorganismes dit dénitrifiants dans le sol *via* le processus de dénitrification. Ceci représente jusqu'à 60 % de pertes d'azotes dans les écosystèmes (Oenema et al., 2009). Ainsi, la plupart des engrais azotés utilisés dans l'agriculture ne sont pas directement utilisables par les cultures et leurs applications sont souvent surévaluées afin de pallier aux pertes liées aux microorganismes, aux phénomènes de lessivage et de volatilisation, amenant dès lors à utiliser d'avantage d'engrais que la plante nécessite (Bouwman et al., 2005). L'utilisation excessive d'engrais en agriculture peut par conséquent poser des problèmes de pollutions sur les écosystèmes et *in-fine* sur la santé humaine.

2. Les pollutions et risques liés aux nitrates

2.1. Lessivage et émissions de N₂O

Le premier risque réside dans la sortie du nitrate dans les agrosystèmes qui peut être lessivé dans les eaux. En effet, ces éléments azotés sont très solubles et donc facilement entraînés par les eaux de pluie, de ruissellement et d'infiltration (Di and Cameron, 2002; Goulding, 2000). Le lessivage des nitrates dépend des précipitations, et donc selon la période de l'année. Il atteint son maximum en période de faible activité végétative (Wick et al., 2012). Par conséquent, les nappes phréatiques, les réservoirs d'eau, les cours d'eau, les lacs, les rivières ont d'importantes concentrations de nitrates ce qui représente ainsi une pollution aquatique conséquente (Strebel et al., 1989). En effet, le nitrate est l'un des principaux polluants à l'origine de la dégradation de la qualité des eaux de surfaces. Le nitrate est un élément nutritif qui permet, dans les eaux douces, le développement des plantes macroscopiques, des micro-algues ou des bactéries (Lewis Jr et al., 2011). Ces dernières peuvent provoquer, par l'importance des quantités d'oxygène qu'elles consomment, une asphyxie du milieu que l'on qualifie de phénomène d'eutrophisation. A terme, ces déséquilibres ont de nombreuses conséquences néfastes, telles que le développement de plantes ou de bactéries indésirables ou toxiques (cyanobactéries, phytoplanctons), l'asphyxie de poissons et la diminution de la richesse du milieu en espèces animales, végétales et donc de la biodiversité (Kononen, 2001; Yang et al., 2008). Par ailleurs, dans les eaux côtières, les nitrates issus des champs de la région suivent naturellement l'écoulement de l'eau du bassin versant jusqu'à la mer. Les apports excessifs d'azote en mer favorisent la prolifération d'algues vertes connues sous le nom de

marée verte (Charlier et al., 2006) (Figure 2). Au cours de ces 20 dernières années, ce phénomène a pris une ampleur considérable, notamment en Bretagne, tant par sa régularité que par son extension, avec les mêmes effets néfastes sur les écosystèmes (Charlier et al., 2008).



Figure 2 : Photographie d'une marée verte en Bretagne signe d'un phénomène d'eutrophisation des eaux côtières (photographie libre de droit).

Rappel 1 : Dans les écosystèmes, l'azote est soumis à plusieurs transformations (Bothe et al., 2006) (Figure 3). L'azote organique rentre sous différentes formes dans les écosystèmes soit par engrais, rejets d'égouts, bétails, détritiques organiques et voire fixation du N_2 atmosphérique (Herbert, 1999). Cet azote est ensuite assimilé et soumis à des réactions par des microorganismes le transformant par minéralisation (Cabrera et al., 2005) dans une forme minérale comme l'ammonium. Ce dernier peut être alors soumis aux phénomènes de nitrification le transformant en nitrate (Ward et al., 2011), lui-même transformable en N_2 , N_2O et NO par dénitrification (Wallenstein et al., 2006). Ces processus peuvent représenter des pertes, soit par un retour atmosphérique de certaines formes gazeuses issues de la dénitrification, soit par lessivage dans les sols (Oenema et al., 2009). Ces pertes diverses peuvent ainsi provoquer des problèmes de pollutions et/ou de santé sur l'individu.

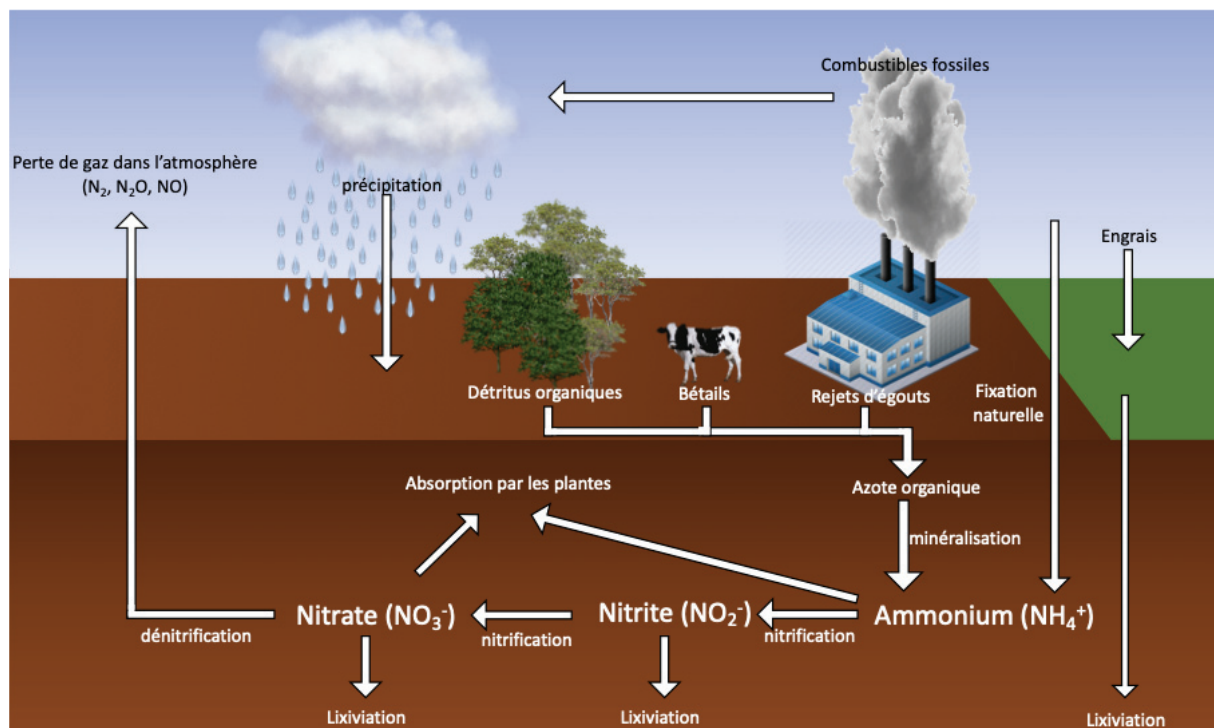


Figure 3 : Étapes et devenir des principales molécules du cycle de l'azote. L'azote organique rentre dans les écosystèmes via différentes voies d'entrées et est alors transformé par des microorganismes en azote minéral plus facilement assimilable par les plantes, mais soumis à la lixiviation et aussi aux transformations microbiennes aboutissant à la formation de la forme gazeuse de l'azote retournant à l'atmosphère.

De plus, lorsque les nitrates sont dans un milieu pauvre en oxygène, ils peuvent être utilisés comme substrat dans les processus respiratoires anaérobies des bactéries dénitrifiantes, ce qui va conduire successivement à des composés moins oxydés de l'azote. Au cours de ces transformations, du NO et du N₂O peuvent être dégagés depuis les sols voire les eaux. Ces deux éléments sont des gaz étant des polluants atmosphériques (Fenger, 2009; Winiwarter and Klimont, 2011). Le N₂O est un précurseur de l'ozone néfaste pour la végétation dans les basses couches de l'atmosphère (Seinfeld and Pandis, 2016). Le N₂O est un puissant gaz à effet de serre : 1000 fois moins concentré que le CO₂, mais avec un potentiel de réchauffement global jusqu'à 300 fois plus important, contribuant à près de 7,5 % de l'accroissement de l'effet de serre (Ravishankara et al., 2009). L'activité microbienne de dénitrification constitue la principale source naturelle de N₂O dont l'augmentation de la concentration dans l'atmosphère est en relation directe avec l'utilisation des fertilisants azotés (Reay et al., 2012). D'ailleurs, en 2014, d'après une source du Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique (Citepa 2016), le dégagement de N₂O représentait en Europe 250 millions de tonnes en équivalent CO₂ dont près de 78 % provenant de l'agriculture, et 45.2 Mt CO₂ éq en France, dont 82 % dus à l'agriculture.

De plus, les cultures peuvent être extrêmement sensibles à la concentration de nitrate dans le sol (Santamaria, 2006). En effet, certains légumes cultivés sur des terres amendées en engrais à base de nitrate ont des concentrations en nitrate au-dessus de la moyenne dans leurs tissus et qui peuvent même dépasser les normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Par exemple, le céleri, la betterave et la laitue ont des concentrations en nitrate qui peuvent varier du simple au triple en fonction de la teneur en nitrate des sols (Santamaria et al., 1999), ce qui peut induire une concentration accrue en nitrate dans l'alimentation de l'individu.

2.2. Risques sur la santé humaine

Dans l'environnement, les nitrates et nitrites sont présents sous forme d'ions non volatiles, et ne peuvent donc pas être inhalés (Lundberg et al., 2008). Concernant l'absorption par voie cutanée, aucune information à ce sujet n'a été démontrée dans la littérature. Par conséquent, la principale voie d'absorption de ces substances est l'ingestion. Ainsi, le consommateur est exposé aux nitrates lessivés dans les eaux et à ceux présents dans la nourriture (Hord et al.,

2009; Ward et al., 2005). La population consomme régulièrement des nitrates, généralement à faible dose (Green et al., 1981; Van Velzen et al., 2008). Ils sont apportés par les légumes et les fruits, par l'eau qui a filtré à travers les sols plus ou moins amendés en nitrate, voire par des produits enrichis en nitrates ou en nitrites utilisés comme agents de conservation des aliments (Anjana and Iqbal, 2007; Russell and Gould, 2003; Shrimali and Singh, 2001).

L'augmentation des teneurs en nitrates dans les eaux fluviales et souterraines lors de ces dernières années a amené l'OMS à s'interroger sur sa toxicité. Des travaux ont ainsi conduit l'OMS à définir une dose journalière admissible de nitrates dans l'alimentation d'une personne en fonction de son poids : $3,7 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$, généralement ramené à $250 \text{ mg} \cdot \text{jour}^{-1}$ pour une personne pesant 70 kg. Cette absorption de nitrates, à faible dose, est considérée parfois comme bénéfique pour la santé car il a été notamment démontré des effets favorables sur la pression artérielle et sur le fonctionnement cardiaque (Carlström et al., 2010). Cependant, l'attention des autorités sanitaires a porté principalement sur deux risques identifiés consécutifs à une telle absorption : la maladie bleue des nourrissons ou méthémoglobinémie (Wright et al., 1999), et la possibilité de production de nitrosamines cancérigènes à partir des nitrites dérivés des nitrates (Sindelar and Milkowski, 2012). On sait en effet que jusqu'à 20 % des nitrates peuvent être transformés naturellement en nitrites par les microorganismes du tube digestif humain comme la bactérie nitrate réductrice *Escherichia coli* (Powlson et al., 2008). Ces nitrites sont des composés plus réactifs que les nitrates et peuvent passer dans le sang puis se fixer sur l'hémoglobine dont ils inhibent le fonctionnement pour le transport de l'oxygène, lorsqu'ils sont formés en quantité importante (Greer and Shannon, 2005). On attribue ainsi la méthémoglobinémie des nourrissons à cette formation de nitrites consécutive à une absorption excessive de nitrates par l'eau ou par des produits alimentaires trop riches en nitrates (Shuval and Gruener, 2013). Les observations épidémiologiques ont conduit l'OMS à définir une norme de concentration maximale acceptable de nitrates dans l'eau potable ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) principalement basée sur le risque induisant cette pathologie. Autre source de danger possible, la possibilité de formation de composés cancérigènes à partir de ces mêmes nitrites. En conditions de laboratoire, les nitrites sont à l'origine de réactions conduisant à la formation de nitrosamines dont les propriétés cancérigènes sont largement reconnues (Larsson et al., 2006; Minami et al., 2012; Song et al., 2015). En se basant sur les études sur l'accroissement du nombre de cancers, le domaine médical recommande de limiter l'exposition aux composés nitrosés en réduisant la

concentration de leurs précurseurs dans l'environnement, notamment les nitrates. C'est pour cela que la directive européenne 91/676/CEE du 12 décembre 1991 dite « directive Nitrates » est la base de l'action de l'État en matière de lutte contre les nitrates d'origine agricole. Elle fixe trois grandes obligations aux États membres : (1) désigner des zones vulnérables dans lesquelles la concentration en nitrates approche ou dépasse les 50 mg.L⁻¹, et les zones aquatiques et côtières soumises aux phénomènes d'eutrophisation. (2) Mettre en œuvre dans ces zones des programmes d'action permettant de réduire la pollution par des mesures de limitation des périodes d'épandages, de gestion des sols et la réduction d'azotes épandues. (3) Rendre, tous les 3 ans à la Commission européenne, des actions engagées et les résultats obtenus sur la qualité des eaux. Cette directive pousse alors les autorités et les agricultures à trouver des solutions plus durables pour la santé des individus et des écosystèmes, en diminuant ou substituant les apports d'engrais azotés dans les sols agricoles.

3. L'azote du sol est soumis à plusieurs processus microbiens

Certains microorganismes comme évoqué précédemment sont capables à la fois de renouveler le stock d'azote dans le sol mais aussi de le consommer et de le transformer en des formes gazeuses inaccessibles aux plantes. Leurs rôles dans les sols sont variés et touchent toutes les étapes du cycle de l'azote.

3.1. Le cycle de l'azote dans l'environnement

L'azote est un facteur essentiel pour tout organisme vivant et un des principaux nutriments limitants dans les écosystèmes. La plus grande source d'azote accessible est le diazote (N₂) atmosphérique (78 % de l'atmosphère terrestre) et les organismes vivants assimilent les différentes formes présentes dans l'environnement telles que le nitrate (NO₃⁻) et/ou l'ammonium (NH₄⁺) ([Hodge et al., 2000](#)) ([Rappel 2](#)).

Rappel 2 : L'assimilation d'une forme azotée plutôt qu'une autre, réside dans un équilibre métabolique. Les plantes absorbent essentiellement les formes inorganiques de l'azote comme le nitrate et l'ammonium (Hodge et al., 2000) alors que les formes organiques sont assimilées par les microorganismes. Les plantes vont assimiler l'une ou l'autre forme selon leurs métabolismes. L'assimilation d'ammonium est moins coûteuse en énergie (Salsac, 1987) car l'ion est assimilé directement, grâce à l'action de la glutamine synthase, alors que l'assimilation du nitrate nécessite d'abord sa double réduction en NO_2^- puis en NH_4^+ (Tischner, 2000). Cependant, l'ion NH_4^+ s'avère être toxique pour la plante à certaines concentrations et cette toxicité peut contrebalancer l'avantage énergétique de l'assimilation du NH_4^+ plutôt que du NO_3^- (Britto and Kronzucker, 2002). De plus, la faible toxicité du NO_3^- lui confère l'avantage d'être facilement stockable dans les tissus végétaux (Bloom et al., 2002). Le NH_4^+ est chargé positivement et peut être retenu sur les complexes organo-minéraux du sol, le rendant ainsi moins accessible que le NO_3^- . A l'inverse, le NO_3^- via sa charge négative est davantage mobile et susceptible d'être lessivé et donc de sortir du système (Bothe et al., 2006). Cependant, la mobilité du NO_3^- lui confère une capacité de diffusion vers les racines plus élevée (Bloom et al., 2002).

Ainsi, les microorganismes sont des acteurs importants dans la transformation de l'azote. Ces transformations microbiennes sont soumises à plusieurs processus distincts qui seront abordés pour chaque étape du cycle de l'azote (Figure 3). Les différentes étapes du cycle de l'azote sont la fixation du N_2 atmosphérique, la nitrification, la dénitrification et la minéralisation (Figure 4).

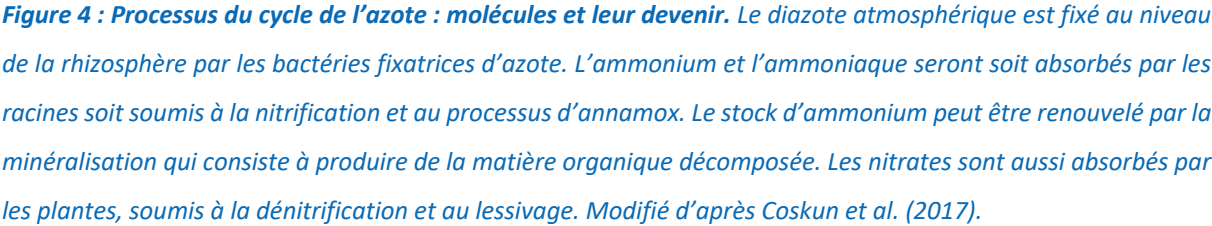
3.1.1. La fixation du N₂ atmosphérique

La fixation du N₂ est un processus exclusif aux organismes procaryotes. Les bactéries fixatrices d'azote peuvent se retrouver sous forme libre dans le sol comme les genres *Azotobacter* (Jiménez et al., 2011) ou *Clostridium* (Burns and Hardy, 2012) ou être en symbiose avec la plante comme *Frankia* (Schwintzer, 2012) et *Rhizobium* (Masson-Boivin et al., 2009).

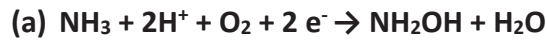
La fixation du N₂ consiste à capturer ce N₂ et le transformer en ammoniacque.



Ce processus se fait grâce à une enzyme appelée la nitrogénase (Hoffman et al., 2014). Le processus de fixation se fait en condition anaérobique, le dioxygène dénaturant la nitrogénase (Rees et Howard, 2000). Pour se faire, certaines symbioses entre plantes et bactéries développent des structures racinaires permettant aux bactéries d'être en anaérobie (Rees et Howard, 2000). C'est le cas des nodosités formées lors de l'association entre les *Rhizobium* et les fabacées, structures végétales qui se forment à partir des poils absorbants de la racine (Wang et al., 2010).



étapes (a) l'oxydation du NH_3 en hydroxylamine (NH_2OH) *via* une ammonia monooxygénase (AMO) et (b) l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite par une hydroxylamine oxydoréductase (Caranto and Lancaster, 2017).



(2) La nitratisation qui correspond à l'oxydation du nitrite en nitrate (Patel et al., 1999). Elle est réalisée par les bactéries et les archées nitratantes comme *Nitrobacter* (Hagopian and Riley, 1998; Wett and Rauch, 2003). Les nitrites sont ainsi oxydés en nitrates par une nitrite oxydoréductase (Abeliovich, 2006).



3.1.3. Oxydation anaérobie de l'ammonium (Anammox)

L'ammonium en anaérobie est également soumis au processus d'anammox (Figure 4). A partir de l'ammonium et du nitrite, il y a formation de N_2 par l'action de microorganismes *via* les intermédiaires hydrazine (N_2H_4) et monoxyde d'azote (NO) (Hayatsu et al., 2008; Kartal et al., 2011). L'ion ammonium a une faible mobilité contrairement à l'ion nitrate qui est mobile. Cette mobilité explique que les nitrates puissent être soumis selon les conditions de culture et climatiques à une lixiviation par les eaux de pluie et apportés dans les nappes à hauteur de 19% (Van Der Heijden et al., 2008). Ces deux sources d'azote sont également soumises à des pertes dues à la volatilisation (18%) et à la dénitrification (59%) (Lin et al., 2001; Oenema et al., 2009).

3.1.4. La dénitrification

La dénitrification désigne la réduction du nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) puis en oxyde nitreux (N_2O) et en dinitrogène (N_2). Ce processus intervient en anaérobiose ou à faible concentration en oxygène (Lecomte et al., 2018). Les dénitrifiants utilisent les formes d'azote oxydées comme accepteurs terminaux d'électrons dans leur chaîne respiratoire en remplacement du dioxygène (O_2) (Wallenstein et al., 2006). Ainsi, la dénitrification peut être considérée comme une forme de respiration alternative. Le nitrate est dans un premier temps transporté dans le cytoplasme des bactéries dénitrifiantes par la pompe NarK. Le nitrate est ensuite réduit par ces microorganismes, *via* deux enzymes homologues, à savoir la nitrate réductase transmembranaire (Nar) et la nitrate réductase périplasmique (Nap), qui sont codées respectivement par les gènes *narG* et *napA* (ce dernier n'est pas présent chez tous les dénitrifiants). Selon les microorganismes, la réduction des nitrites (NO_2^-) en monoxyde d'azote (NO) implique deux nitrites réductases (Nir), l'une couplée au cuivre (codée par *nirK*) et l'autre au cytochrome cd1 (codée par *nirS*). A noter que certains dénitrifiants peuvent posséder les deux comme *Bradyrhizobium oligotrophicum* (Sánchez and Minamisawa, 2018). La transformation du NO en N_2O implique la NO réductase (Nor), qui est une enzyme transmembranaire codée par le gène *norB* (Wallenstein et al., 2006). Enfin, la N_2O réductase (Nos), qui transforme le N_2O en N_2 , est une enzyme périplasmique codée par le gène *nosZ* (Khalil, 2003). Toutes ces transformations se font au niveau de la membrane des dénitrifiants (Figure 5) et aboutissent à une perte d'azote dans le système par le dégagement des gaz N_2 et N_2O (Richardson et al., 2009).

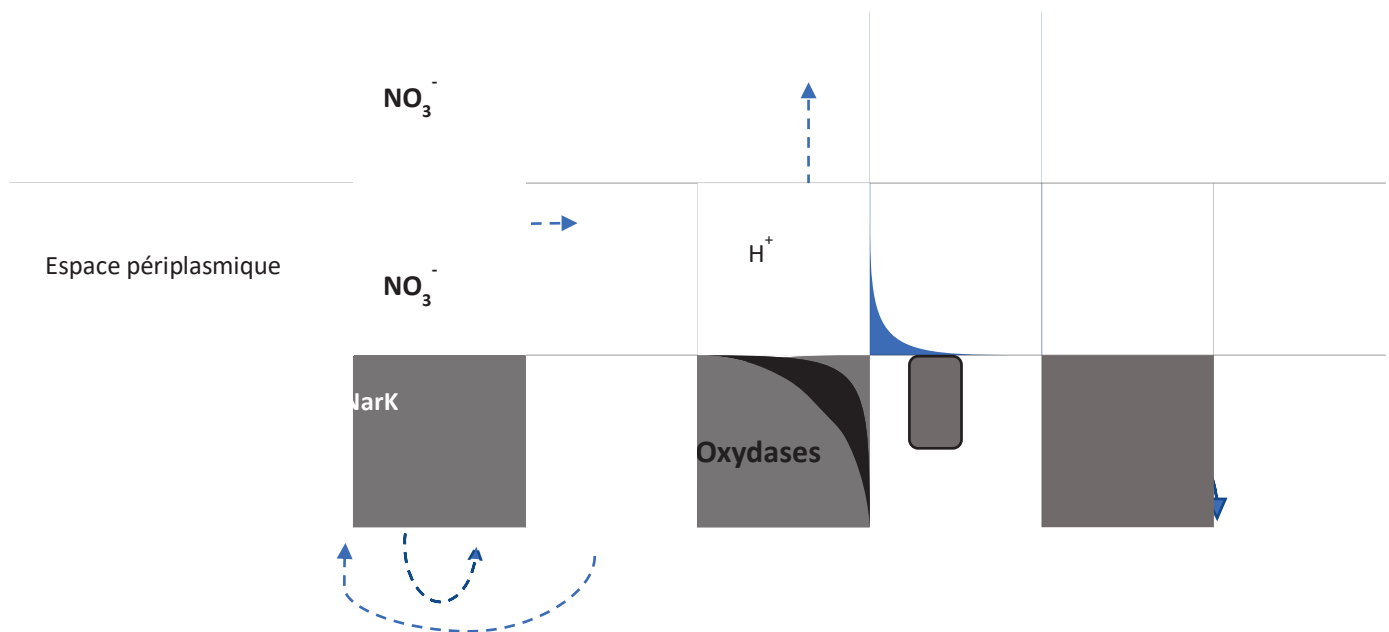


Figure 5 : Ensemble des enzymes et composés azotés impliqués dans le phénomène de dénitrification au niveau de la membrane des bactéries dénitrifiantes. Le nitrate est diffusé à l'intérieur de l'espace périplasmique et transporté par la pompe NarK dans le cytoplasme, où il sera transformé en nitrite qui retournera via la pompe NarK dans l'espace périplasmique. C'est ici que le nitrite subira différentes transformations via différentes réductases jusqu'au NO , N_2O et N_2 qui pourront retourner dans l'atmosphère.

3.1.5. La minéralisation

La minéralisation est également un processus du cycle de l'azote permettant un nouvel apport en nutriments azotés pour les plantes et les microorganismes (Cabrera et al., 2005). Cette étape, majoritairement aérobie, représente la conversion d'azote organique en azote minéral. Les résidus organiques présents à la surface du sol ou incorporés à celui-ci subissent une décomposition par la biomasse microbienne présente dans le sol et/ou dans les résidus ainsi que par d'autres organismes décomposeurs (vers de terre etc.). Ils se nourrissent de bio-déchets et les digèrent. Cette digestion va donner lieu à une nouvelle matière, l'humus, qui sera consommé par d'autres organismes. Une portion du carbone en décomposition se transforme en CO_2 et la communauté microbienne en assimile une partie pour réaliser ce processus. Pour que la minéralisation ait lieu, la quantité d'azote présente initialement dans la biomasse doit être supérieure à celle requise par les microorganismes (Gilmour et al., 2003). L'azote est alors minéralisé par les micro-organismes et des enzymes extracellulaires tels que la protéase, la désaminase et l'uréase (Zaman et al., 1999). Les apports azotés dans le sol pour les plantes dépendent de la minéralisation de l'azote organique en azote minéral sous forme de nitrate et d'ammonium (Van Der Krift and Berendse, 2001).

4. Interaction plante- microorganisme : impact sur le cycle de l'azote

Ainsi les microorganismes présentent un rôle prépondérant dans l'assimilation de l'azote par les plantes. Certaines de ces plantes sont dès lors capables d'interagir avec les microorganismes pour modifier le cycle de l'azote *via* différents composés.

Les plantes, à travers l'exsudation racinaires de métabolites primaires et secondaires, peuvent à la fois être attractives et répulsives pour les microorganismes du sol (Haichar *et al.*, 2014). Les plantes synthétisent des métabolites chimio-attracteurs de microorganismes phyto-bénéfiques du sol qui permettent aux plantes de limiter les infections dues aux maladies *via* la production de composés antimicrobiens et/ou *via* l'induction de résistance de la plante face à celles-ci. Certains microorganismes sont également capables de stimuler la croissance de la plante *via* la production de phytohormones (Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2014). Les exsudats racinaires ont une importance quant à la diversité des communautés microbiennes du sol et leurs fonctions au sein de la rhizosphère (Haichar *et al.*, 2014). Ainsi, certaines plantes *via* les exsudats racinaires sont capables d'interagir avec les microorganismes du cycle de l'azote. Ces interactions peuvent être positives ou négatives. Positives si chacun des deux protagonistes prend avantage de l'interaction, ou négatives si l'un des deux protagonistes est inhibé par l'autre.

4.1. Interactions positives plantes-microorganismes du cycle de l'azote

4.1.1. La fixation biologique du N₂ (BNF, Biological Nitrogen Fixation)

La fixation de l'azote se fait par la symbiose entre des plantes et des bactéries (Mylona *et al.*, 1995). Les plantes ne sont pas capables d'assimiler par elles-mêmes les diazotes atmosphériques représentant pourtant la source d'azote la plus importante sur Terre (Hodge *et al.*, 2000). Le diazote est une molécule stable où les deux atomes d'azotes sont liés par une triple liaison. Cette dernière ne peut être dissociée par les organismes eucaryotes, mais peut l'être par des bactéries disposant des enzymes nitrogenases qui permettent de transformer le diazote en ammoniac, puis en ammonium qui pourra lui-même être nitrifié en nitrate (Geisseler *et al.*, 2010). Ce processus est très coûteux en énergie, c'est pour cela que les bactéries fixatrices d'azotes ont besoin de la symbiose avec les plantes afin d'obtenir de l'énergie apportées *via* la photosynthèse (Franche *et al.*, 2009). Ainsi, certaines plantes de types légumineuses forment une symbiose avec ces bactéries fixatrices du type *Rhizobium*,

formant alors des nodosités ressemblant à des petites excroissances où se trouve ces bactéries, permettant un échange entre les deux partenaires (Begum et al., 2001). La plante transmet des composés carbonés et des sources d'énergie aux bactéries, qui elles, assurent la disponibilité en azote pour la plante (Begum et al., 2001).

Pour se faire, la plante sécrète dans le sol des flavonoïdes qui sont perçus par les bactéries rhizobium *via* une protéine facteur de régulation codée par le gène NodD. Celle-ci déclenche l'expression des gènes *nod* aboutissant à la synthèse d'une molécule signal : le facteur Nod. Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont requis pour la synthèse du squelette de base du facteur Nod, consistant en un dérivé lipochito-oligosaccharidique (LCO) (Geurts and Bisseling, 2002). Ce squelette peut varier en fonction de la bactérie et différents éléments peuvent le composer comme le sulfate, l'acétate ou le méthyle entre autres (Beau, 2011). La perception du facteur Nod par la plante va déclencher une suite de réactions amenant à la formation du nodule (D'haeze and Holsters, 2002). Premièrement, les poils absorbants de la racine vont se déformer ce qui va permettre d'englober les rhizobactéries situées à proximité. Puis il va y avoir formation d'un cordon d'infection conduisant la bactérie jusqu'à un primordium nodulaire. Enfin, les bactéries vont être libérées par endocytose dans les cellules du primordium nodulaire, au sein duquel les bactéries se différencient en bactéroïdes, alors capables de convertir le diazote en ammoniac (Crespi and Gálvez, 2000) (Figure 6).

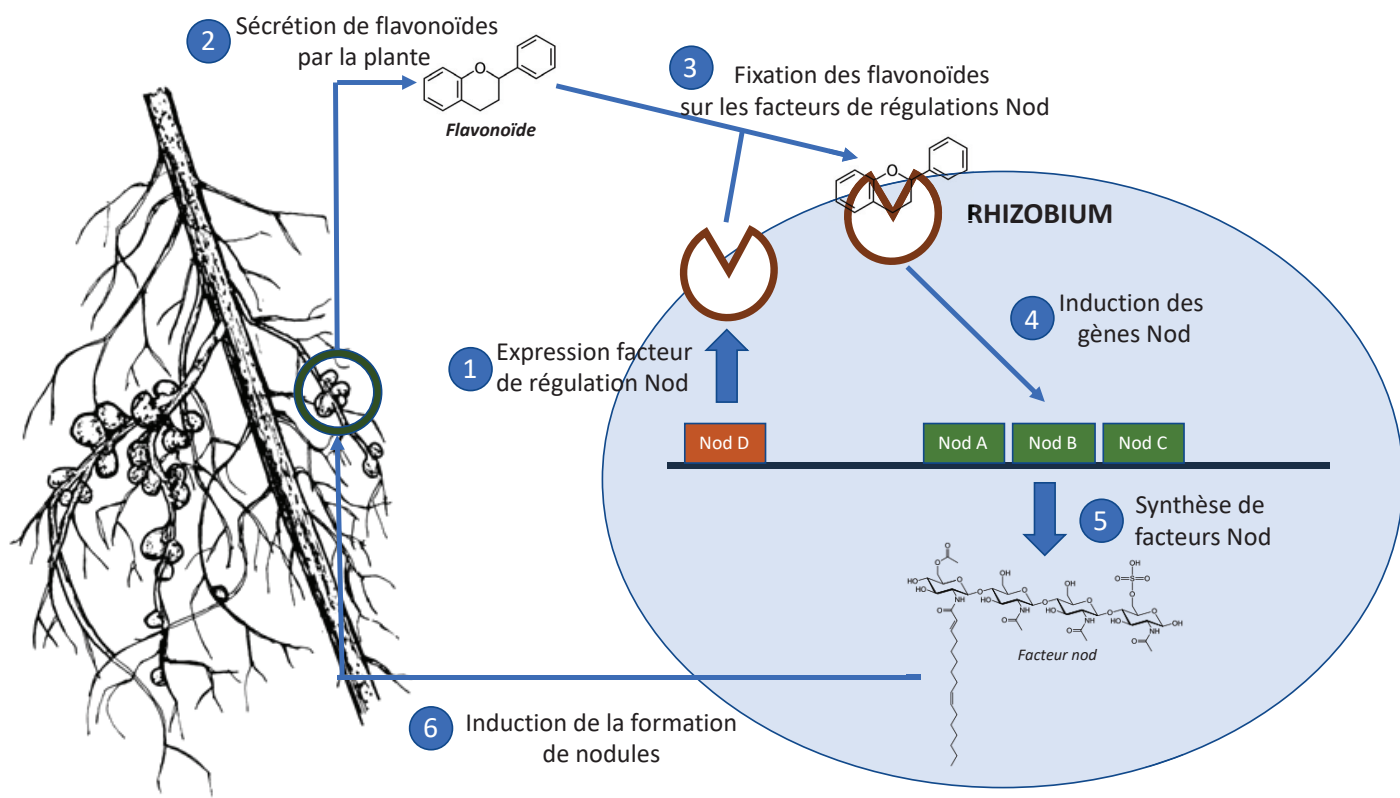


Figure 6 : représentation schématique du mécanisme de formation de nodule. La racine de la plante va excréter via ses racines des flavonoïdes qui vont être identifiés et fixés par des facteurs de régulation produits par Nod D. Cela va induire les gènes NodA, NodB et NodC et aboutir à la formation des facteurs Nod qui vont être le signal pour la plante afin d'induire un changement racinaire qui englobera la bactérie *Rhizobium* et formera une nodosité au sein de laquelle se déroulera la fixation d'azote.

Parmi les légumineuses cultivées, on distingue les légumineuses fourragères (trèfle ou luzerne par exemple) consommées directement par pâturage des prairies ou récoltées sous forme de fourrage, et celles cultivées pour leurs graines (soja, pois, féverole, lupin, haricot) appelées couramment protéagineuses (Lüscher et al., 2014). Ces plantes sont parmi les plus importantes de l'industrie agricole moderne et fournissent près de 35 % des protéines consommées dans le monde (De Ron, 2015). Ainsi la culture des légumineuses fait l'objet d'études quant à l'augmentation des rendements, et certaines études montrent une application de LCO en champs afin d'améliorer la fixation et ainsi les rendements de ces plantes (Smith et al., 2015).

4.1.2. La stimulation de la minéralisation par les plantes

L'étape de minéralisation se fait *via* l'action de microorganismes et consiste à transformer l'azote organique du sol en forme minérale telle que l'ammonium ou le nitrate absorbable par la plante (Bothe et al., 2006). Ainsi la nutrition azotée des plantes dépend grandement de la capacité de minéralisation des microorganismes (Van Der Krift and Berendse, 2001).

Janssen (1996) explique que lorsque le ratio Carbone/Azote (C/N) est faible, c'est-à-dire avec relativement plus d'azote, la minéralisation est plus efficace et la matière organique moins immobilisée dans le sol. Ainsi les plantes régulent les apports de carbone qui contrôlent l'activité microbienne de minéralisation. C'est ainsi que certaines plantes d'après Knops et al. (2002) peuvent influencer sur la minéralisation du sol par leurs caractéristiques propres. En effet, certaines plantes ont une qualité de litières et de détritits moindres, c'est à dire moins carbonées, rendant alors une partie inaccessible aux microorganismes opérant de façon moins efficace la minéralisation. Mais à l'inverse, certaines plantes sont capables de moduler la qualité de leurs feuilles, écorces, autres tissus et *in-fine* de leurs détritits et de leurs ratio C/N, pour que ceux-ci soient davantage assimilés dans le processus de minéralisation et de ce fait rendre davantage d'azote minéral disponible pour la croissance des plantes (Wedin and Tilman, 1990).

4.1.3. Les Plant Growth Promoting Bacteria améliorent l'assimilation de l'azote par les plantes

Les Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) se définissent comme toutes bactéries de la rhizosphère ayant un effet bénéfique sur une plante (Glick, 1995). Les effets des PGPR sur les plantes comprennent un grand nombre d'effets bénéfiques directs ou indirects (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Vacheron et al., 2013). Les PGPR peuvent être à la fois des bactéries symbiotiques mutualistes ou des bactéries libres (Vacheron et al., 2013). Il existe ainsi une grande diversité d'effets des PGPR sur la plante comme la **bio-fertilisation** par la mise à disposition d'éléments tels que le phosphate ou l'azote (Esitken et al., 2003), la **phyto-stimulation** par la production de phytohormone (Khakipour et al., 2008), la **rhizo-remédiation** par la dégradation des polluants (Gerhardt et al., 2009) et en tant que **bio-contrôle** des pathogènes par la production de certains composés antimicrobiens (Sivasakthi et al., 2014). Certaines études démontrent que l'inoculation de plantes par certaines PGPR augmente la taille du système racinaire suite à une phytostimulation. En effet, Adesemoye et al. (2008) démontrent qu'à la suite d'ajout de PGPR commerciales de type *Bacillus* sp. en champs il y a augmentation de la taille des racines des plantes et qu'en parallèle il y a moins d'azote dans le sol, davantage consommé par des plantes inoculées que des plantes non inoculées. De la même manière, Dal Cortivo et al. (2017) observent qu'après inoculation de PGPR (*Azospirillum* spp., *Azoarcus* spp. et *Azorhizobium* spp.) sur du blé, la masse racinaire augmentait ainsi que le contenu en azote dans les tissus. Ainsi, les PGPR en stimulant la croissance du système racinaire, permettent à la plante d'assimiler davantage d'azote dans le sol pour sa croissance.

4.2. Interactions négatives plantes-microorganismes du cycle de l'azote

4.2.1. L'inhibition de la minéralisation

Certaines plantes peuvent inhiber de façon plus directe le phénomène microbien de minéralisation plutôt que de moduler la qualité de leurs litières dans le but de stimuler la minéralisation. En effet, des études montrent que certaines plantes sont capables d'exsuder des molécules tels que des terpénoïdes, des stérols ou des flavonoïdes (Dietz et al., 2013; Heumann et al., 2013, 2011) responsables de l'inhibition de la minéralisation. Ces molécules d'après Heumann et al. (2013) ne sont pas spécifiques aux microorganismes responsables de la minéralisation mais agissent comme antimicrobiens, ou dans le cas des flavonoïdes comme

molécules capables de piéger la matière organique, la rendant alors inaccessible à la minéralisation (Bradley et al., 2000).

Bien que la minéralisation soit un phénomène vital pour la croissance des plantes, cette inhibition de la minéralisation peut être profitable aux plantes en association avec des champignons mycorhiziens éricoïdes (Kraus et al., 2003). En effet, les mycorhizes éricoïdes produisent des enzymes extracellulaires comme des polyphénols oxydases et des tannins carboxyles estérases capables de dégrader les complexes protéines-tannins (Kraus et al., 2003). Le phénomène de l'inhibition de la minéralisation de l'azote entraîne l'augmentation du pool d'azote organique du sol qui est davantage disponible pour les microorganismes que pour la plante. Ainsi, ce processus entraîne une action négative chez les plantes dépourvues d'associations symbiotiques mycorhiziennes et une action positive chez celles mettant en place cette stratégie de symbiose (Joanisse et al., 2009).

4.2.2. L'inhibition biologique de la nitrification (BNI, Biological Nitrification Inhibition)

4.2.2.1. Mise en évidence du phénomène

Une grande majorité des systèmes agricoles utilisent des apports importants d'azote où l'ammonium est la principale source et substrat pour le processus de nitrification (Qiao et al., 2015). La nitrification est un processus microbien s'effectuant principalement en aérobie (Sun et al., 2015) sous l'action de la communauté microbienne comme les bactéries (Ammonia Oxidizing Bacteria : AOB) et les archées (Ammonia Oxidizing Archeae : AOA) oxydant l'ammonium, qui génère de l'hydroxylamine (NH_2OH), des nitrites par nitratation et des nitrates par nitrations, à partir d'ammonium et/ou d'ammoniac (Coskun et al., 2017). La transformation de l'ammonium en nitrate rend l'apport d'engrais azotés sensible aux pertes associées au lessivage de nitrate et aux émissions de N_2O et/ou de N_2 .

Certaines plantes ont la capacité d'inhiber voire de supprimer le processus de nitrification en libérant des inhibiteurs par exsudation racinaire. On parle alors d'inhibition biologique de la nitrification (BNI) (Subbarao et al., 2007, 2009). En effet, Subbarao et al. (2007) ont testé les exsudats racinaires de 18 plantes dont le sorgho (*Sorghum bicolor*), le mil à chandelle (*Pennisetum glaucum*), l'arachide (*Arachis hypogaea*) et *Brachiaria humidicola* sur une bactérie modèle de la nitrification : *Nitrosomonas europaea*. Chacun des exsudats racinaires

de ces espèces induisait une inhibition de la nitrification chez la bactérie modèle pouvant être quasi-totale (>90%) chez *Brachiaria humidicola*.

4.2.2.2. Molécule impliquée

A partir des exsudats racinaires de *Brachiaria humidicola*, Subbarao et al. (2009) ont mis en évidence une molécule responsable de ce BNI. Cette molécule inhibitrice de la nitrification, nommée brachialactone (Figure 7A), est un diterpène possédant un cycle de β -lactone. Cette molécule a induit une inhibition croissante de l'activité de *Nitrosomonas europaea* en fonction de la concentration de brachialactone (Figure 7B) et jusqu'à 90 % des émissions de N_2O en sol comparé à un témoin.

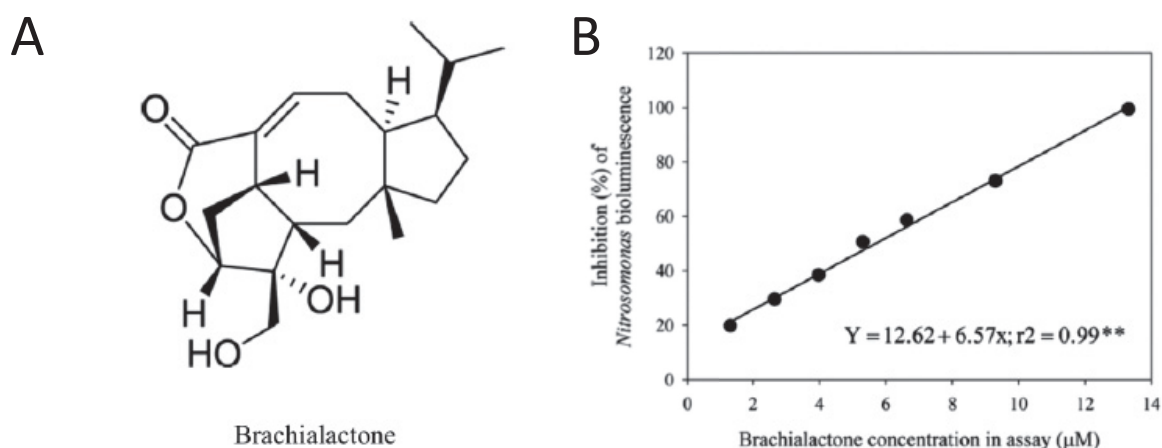


Figure 7 : Effet de brachialactone sur la nitrification. (A) Représentation de la molécule de brachialactone. (B) Graphique représentant l'inhibition de la bactérie nitrifiante modèle *Nitrosomonas europaea* (%) en fonction de la concentration de brachialactone (μ M). (Subbarao et al., 2009).

4.2.2.3. Mécanismes d'actions des brachialactones

La libération de la brachialactone est due à une régulation végétale basée sur la présence de l'ammonium dans la rhizosphère. En effet, la brachialactone est libérée si et seulement si les racines sont soumises au contact de l'ammonium (Subbarao et al., 2008). Le mode d'action de la molécule est basé sur le blocage des deux voies enzymatiques de l'ammonium monooxygénase (AMO) et de l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) (Figure 8). Ces deux enzymes sont impliquées dans l'oxydation de l'ammonium. L'ammonium oxydase a pour fonction de métaboliser l'ammonium en hydroxylamine *via* la première étape de la

nitrification. L'hydroxylamine oxydoréductase transforme l'hydroxylamine en nitrite à travers la deuxième étape de la nitrification (Qiao et al., 2015). Le pouvoir réducteur provoqué par l'oxydation de l'hydroxylamine par HAO est dû à son passage à travers le cytochrome c-554 aux deux cytochromes aa3 oxydase et ubiquinone, ensuite utilisé pour la réduction de NAD(P)H₂. Le cytochrome c-554 est une protéine périplasmique associée à la membrane de ces bactéries et liée à des vésicules phospholipidiques des microorganismes (McTavish et al., 1995). Ainsi, via l'altération de la membrane, l'hydroxylamine produit à partir d'ammonium ne peut être transformé en nitrite et la première étape de la nitrification (nitritation) est supprimée. Ces deux voies enzymatiques peuvent aussi également être inhibées par des acides gras présents dans les tissus foliaires de *B. humidicola* comme les acides linoléique et linoléique (Subbarao et al., 2013). Dans les trois années qui ont suivi leurs établissements, les pâturages de *Brachiaria* ont supprimé les populations de nitrifiants du sol (déterminés à partir de la mesure de l'abondance du gène *amoA*, de bactéries et des archées oxydant l'ammoniac), ainsi que les émissions d'oxydes nitreux.

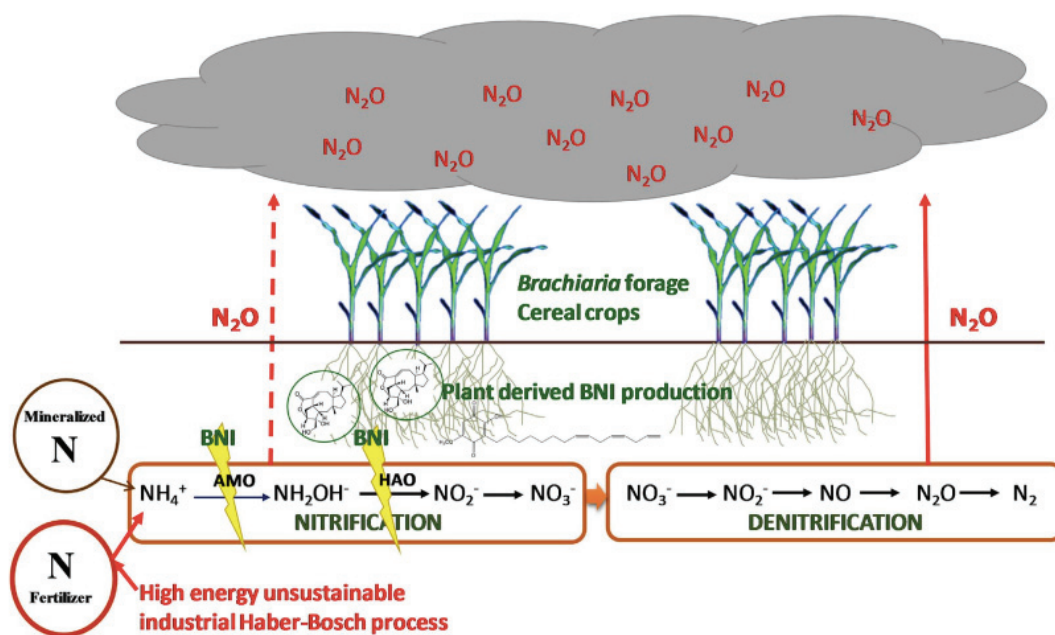


Figure 8 : Schéma de l'inhibition biologique de la nitrification lorsque les systèmes racinaires végétaux produisent des inhibiteurs de nitrification supprimant l'activité nitrifiante dans les sols afin de réduire la formation de NO₃⁻, faciliter l'immobilisation du NH₄⁺, l'absorption du NH₄⁺ par les plantes et la réduction des émissions de N₂O. (D'après Subbarao et al., 2017)

Subbarao et al. (2015), indiquent donc que ce phénomène pourrait diminuer drastiquement les émissions de N_2O en limitant ou supprimant la nitrification des sols, et qu'une solution pourrait consister à utiliser les plantes capables d'induire le BNI pour diminuer les pertes d'azote dans les agrosystèmes ; bien que ce phénomène n'ait été observé que dans des écosystèmes précis et reproduit uniquement en laboratoire.

4.2.2.4. Phénomène de BNI chez d'autres plantes

De plus, d'autres études démontrent que le BNI est un processus présent chez d'autres plantes comme le sorgho par exemple, qui libère d'autres composés que la brachialoactone comme la sakuranetine (Figure 9A) et la sorgoleone (Figure 9B) qui peuvent aussi avoir un rôle d'inhibiteur de la nitrification (Subbarao et al., 2013b; Sun et al., 2015).

De même, chez le riz asiatique (*Oryza sativa*), il y a exsudation au niveau racinaire de 1,9-Decanediol (Figure 9C) capable aussi d'inhiber la nitrification (O'Sullivan et al., 2016).

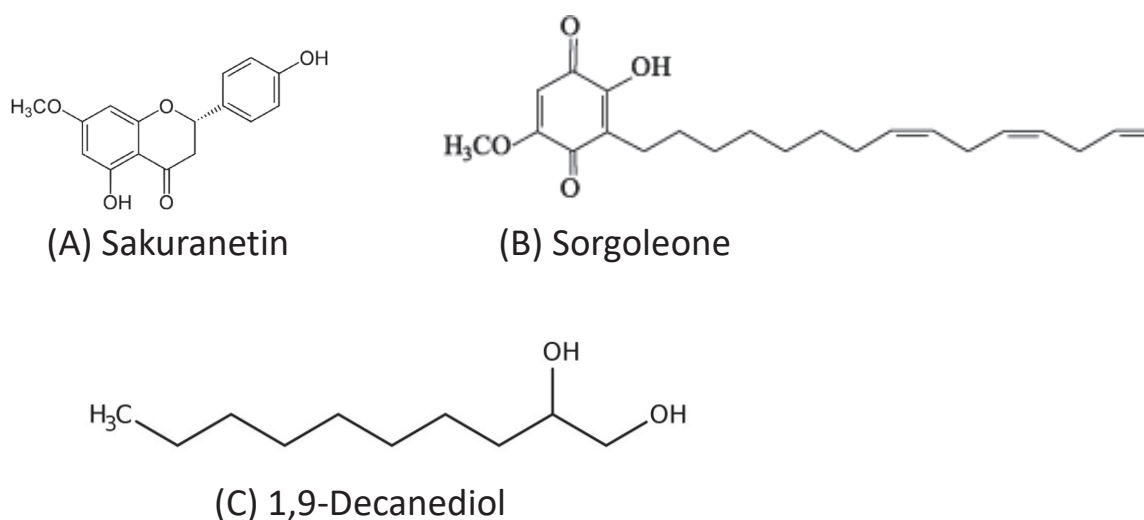


Figure 9 : Schéma des molécules impliquées dans l'inhibition biologique de la nitrification. (A) sakuranetin, (B) sorgoleone et (C) 1,9-decanediol.

Ainsi ce phénomène de BNI ne semble pas se cantonner à une seule plante, plusieurs plantes *via* leurs exsudats sont capables d'inhiber la nitrification, et devront être analysés pour déterminer les molécules responsables du phénomène, qui comme nous l'avons vu précédemment peuvent grandement varier par leurs structures et leurs types.

4.2.3. L'inhibition biologique de la dénitrification (BDI, Biological Denitrification Inhibition)

4.2.3.1. Mise en évidence du phénomène

Comme évoqué précédemment l'une des principales pertes d'azotes dans les écosystèmes se fait par phénomène de dénitrification (Oenema et al., 2009). Les dénitrifiants sont des microorganismes tels que les champignons (Shoun et al., 1992), les archées (Philippot, 2002) et surtout les bactéries (Radersma and Smit, 2011; Van der Salm et al., 2007) qui, dans des conditions de carence en oxygène, utilisent le nitrate comme source de respiration alternative (Lecomte et al., 2018). Dans les cas où la transformation se fait jusqu'à son aboutissement, la dénitrification conduit à la production de N_2 et N_2O . Le N_2 est un gaz qui peut, par la voie de la fixation d'azote, retourner dans le système (Burns and Hardy, 2012), alors que le N_2O est un gaz à effet de serre qui n'est pas assimilable par les organismes vivants et représente une grande perte pour l'écosystème et par ailleurs un risque de pollution atmosphérique (Ravishankara et al., 2009). Les plantes sont donc en compétition avec les bactéries dénitrifiantes pour le nitrate, une compétition d'autant plus forte que les microorganismes sont plus efficaces dans l'assimilation en raison de leurs temps de génération court (Kuzakov and Xu, 2013). C'est en étudiant une plante invasive qu'un mécanisme pouvant limiter ces pertes a été découvert.

Les Renouées Asiatiques (*Fallopia* spp.) forment un complexe d'espèces invasives. Ce complexe regroupe *Fallopia japonica*, *Fallopia sachalinensis* et leurs hybrides interspécifiques *F. x bohemica* (Aguilera et al., 2010). Originaires d'Asie, les espèces parentales ont été importées en Europe au début du XIXème siècle pour leur caractère ornemental et sont maintenant considérées comme l'un des taxons les plus invasifs en Europe (Krebs et al., 2011; Murrell et al., 2011). Dassonville et al. (2011) ont étudié les bases possibles du pouvoir invasif de cette plante et suggèrent que celui-ci pourrait reposer sur un phénomène de construction de niche écologique et chimique par cette plante. Ainsi, au travers de diverses mesures, cette étude a montré qu'au niveau du sol adhérent aux racines de *Fallopia* spp., il y avait une diminution de l'activité microbienne de dénitrification.

4.2.3.2. Molécule impliquée

Pour aller plus loin Bardon et al. (2014) ont analysé l'effet des extraits de rhizomes de *Fallopia* spp. sur l'activité de dénitrification de plusieurs souches de bactéries dénitrifiantes. Celles-ci

ont été diminués jusqu'à 92 %. L'analyse des extraits a permis de mettre en évidence que ce pouvoir inhibiteur est dû aux métabolites secondaires de *Fallopia* spp.. Ainsi, cette plante serait capable d'instaurer une stratégie végétale qui a été appelée l'inhibition biologique de la dénitrification (BDI), et d'après (Bardon et al., 2016a) ce pouvoir sera dû à des flavonoïdes de la famille des proanthocyanidines : les procyanidines.

Ces procyanidines, une fois purifiées, sont capables d'inhiber jusqu'à près de 80 % l'activité de dénitrification et de façon moindre, aux mêmes concentrations, la respiration aérobie chez *Pseudomonas brassicacearum* NFM421 (Figure 10).

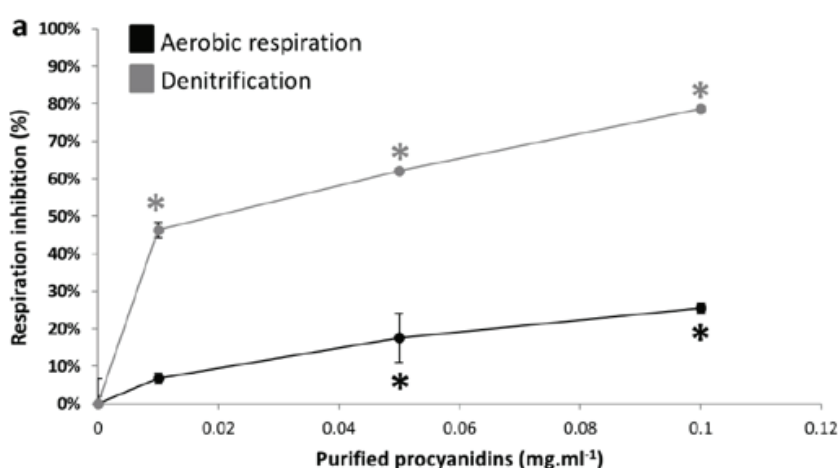


Figure 10 : Graphique représentant le pourcentage d'inhibition de la respiration aérobie (en noir) et de la dénitrification (en gris) en fonction de la concentration en procyanidines purifiées. Les étoiles indiquent une différence significative par rapport au témoin (Bardon et al., 2016a)

Les procyanidines sont des métabolites secondaires tanniques (flavonoïdes) de la famille des proanthocyanidines très présents chez les végétaux. D'un point de vue phytochimique, il s'agit de polymères de catéchines ou de son isomère épicatechine. Ils peuvent soit se former en dimère (procyanidines de type B), soit en trimère (procyanidines de type C). Ils peuvent être différents en fonction du type de monomère constituant le polymère (c'est à dire composé de catéchine ou/et d'épicatéchine), et du type de liaison reliant ces monomères. Dans notre cas les procyanidines démontrées comme étant responsables du BDI sont les procyanidines de type B2, des dimères d'épicatéchine reliés par une liaison 4-6 (Bardon et al., 2014; Lazarus et al., 1999) (Figure 11). Les autres types de procyanidines n'ont pas été discriminés quant à leur

rôle à provoquer un BDI par [Bardon et al. \(2014\)](#) (sauf les monomères catéchines n'ayant aucun effet).

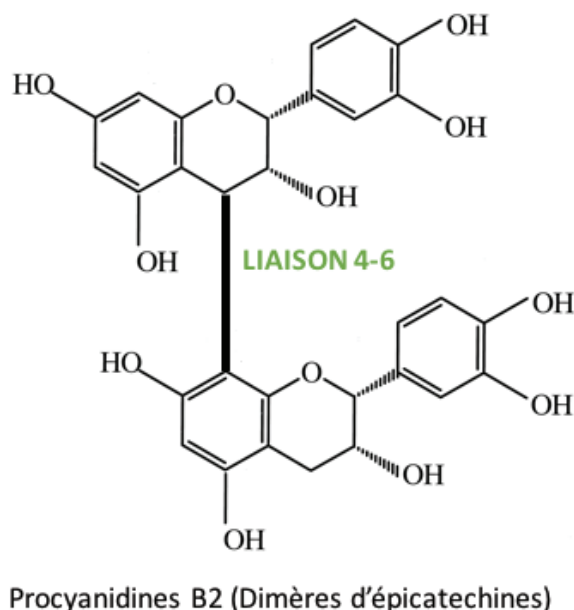


Figure 11 : schéma de procyanidines B2, dimères d'épicatéchine avec une liaison 4-6.

Cette molécule a été mise en évidence pour la première fois lors de l'expédition de Jacques Cartier, explorateur français du XVI^{ème} siècle. Celui-ci découvrant le Québec en plein hiver 1534, a vu son équipage souffrir du scorbut (maladie causée par le manque de vitamine C dans l'organisme) dû à l'absence de fruits dans l'alimentation hivernale. Des indiens autochtones proposèrent en guise de remède une infusion à base d'écorce de pin blanc (*Pinus strobus*) soignant ainsi la maladie et la carence de l'équipage. Ce n'est que 400 ans plus tard en 1948, que Jacques Masquelier, chercheur français de l'université de Laval au Canada, entreprit d'analyser la composition de l'écorce du pin blanc pour comprendre ce pouvoir guérisseur. C'est alors qu'il découvrit que la molécule responsable de cette guérison était un flavonoïde qui fut baptisé et breveté en tant que Pycnogénol. Actuellement, le Pycnogénol est encore appelé ainsi dans le domaine médical, et nommé procyanidine dans le domaine des sciences végétales, bien que les molécules soient en tout point les mêmes ([Fortin, 2006](#); [Romieux, 1993](#)).

4.2.3.3. Mécanismes d'actions des procyanidines

Dans [Bardon et al., \(2016b\)](#), il a été testé sur une bactérie modèle dénitrifiante *Pseudomonas brassicacearum* NFM 421 l'effet des procyanidines. Cette molécule agirait sur le processus de respiration anaérobie en affectant principalement et spécifiquement le fonctionnement de l'enzyme transmembranaire NO_3^- réductase (NarG), responsable de la première étape de dénitrification qui consiste à transformer le nitrate en nitrite. Les procyanidines affectent la dénitrification *via* une déstabilisation de la membrane. Une fois la membrane déstabilisée, il y a changement de conformation de l'enzyme et diminution de son activité et de son affinité pour le nitrate ([Figure 12](#)).

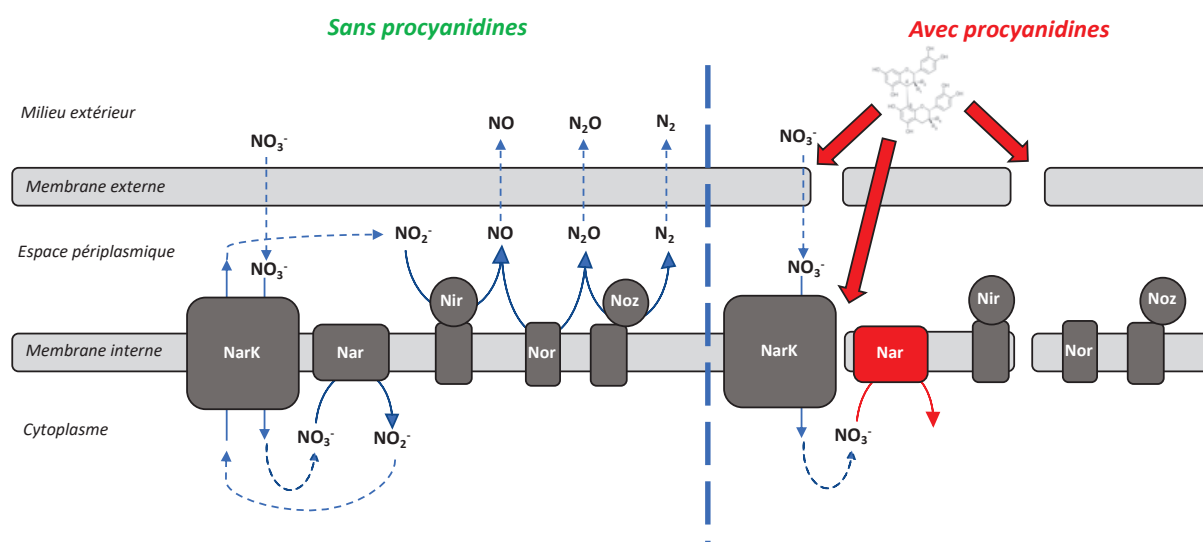


Figure 12 : Schéma représentant le mécanisme d'inhibition biologique de la dénitrification. Les procyanidines inhibent l'enzyme Nar de *P. brassicacearum* NFM421, une bactérie dénitrifiante. Les procyanidines vont perturber la stabilité des membranes et entraîner une instabilité dans la structure de la Nar intégrée dans la membrane interne, entraînant des changements conformationnels de l'enzyme et une perte de fonction. Schéma retravaillé d'après Bardon (2014).

[Bardon et al. \(2016b\)](#) ont observé en microscopie électronique à transmission que les procyanidines à 0,01 et 0,1 mg ml⁻¹ perturbent les membranes de *P. brassicacearum* NFM421 par la formation de vésicules membranaires à la surface des cellules ([Figure 13](#)). Ainsi on peut observer que la fonction de dénitrification est inhibée au niveau des membranes sans affecter la viabilité de la bactérie.

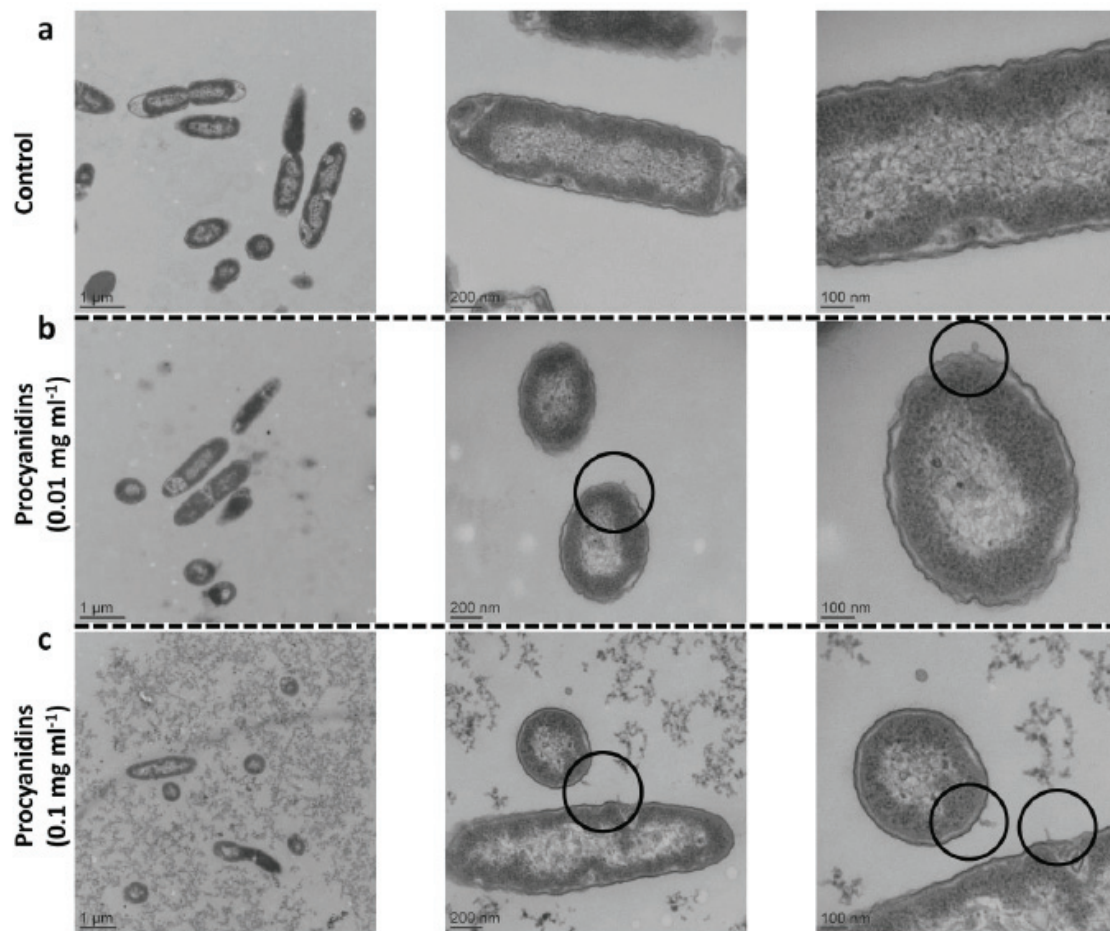


Figure 13 : Micrographies au microscope électronique à transmission de cultures de *P. brassicacearum* NFM421 traitées avec a) 0, b) 0,01 ou c) 0,1 mg.mL⁻¹ de procyanidines. Les cercles noirs mettent en avant les vésicules formées au niveau de la membrane bactérienne (Bardon et al., 2016b).

Ainsi, grâce au BDI, les bactéries dénitrifiantes sont inhibées et consomment moins de nitrate du sol et celui-ci pourrait être ainsi utiliser pour la croissance des plantes. Bardon et al. (2017) ont testé un ajout supplémentaire de procyanidines commerciales (Rappel 3) en sol planté ou non avec *Fallopia*, et ont déterminé, dans un premier temps, que l'ajout de procyanidines en sol pouvait conserver jusqu'à 6 fois la concentration du nitrate par rapport à un sol sans procyanidine. Dans un second temps, cette étude a démontré que l'ajout de procyanidines modifie les traits racinaires et augmente la masse racinaire des *Fallopia* amendées. De ce fait, bien que le phénomène de BDI soit bien décrit, toutes les expériences jusqu'ici ont été réalisées en laboratoire et ne démontrent pas clairement un retour à la plante de l'azote détourné suite au BDI et d'autant plus dans des conditions agricoles.

Rappel 3 : Les proanthocyanidines et plus particulièrement les procyanidines sont des molécules tanniques très représentées dans le monde végétal ([Iwashina, 2000](#)). Issues de la voie métabolique des anthocyanes : composés omniprésents dans le métabolisme secondaire des plantes, il existe tout autant de sources de procyanidines ([Santos-Buelga and Scalbert, 2000](#)).

Certaines plantes contiennent des procyanidines dans les écorces d'arbre comme le Mimosa ([Venter et al., 2012](#)) ou le Quebracho ([Reid et al., 2013](#)). D'autres plantes en possèdent dans la coque de leurs fruits comme la noix ([Regueiro et al., 2014](#)). Certaines comme les Renouées du Japon en contiennent dans leurs extraits racinaires ([Bardon, 2014](#)). Mais la source la plus diversifiée semblerait être au niveau des fruits. En effet, les pépins de pommes ([Tsao et al., 2003](#)), raisins ([Xia et al., 2010](#)), aronies ([Bräunlich et al., 2013](#)), canneberges ([Zou et al., 2012](#)) et bien d'autres contiennent des procyanidines ([Santos-Buelga and Scalbert, 2000](#)).

Lors des expérimentations de [Bardon et al. \(2017\)](#) et celles faites durant cette thèse, la source de procyanidines est issue de pépins de raisins, commercialisée par la société Laffort sous forme d'une poudre commerciale de procyanidines et dont l'usage est d'augmenter la teneur en tannins de vins trop pauvres ([Harbertson et al., 2012](#)).

A noter que des études expliquent que le pouvoir antioxydant dans le vin serait dû en grande partie aux procyanidines ([Xia et al., 2010](#); [Zhou and Raffoul, 2012](#)).

5. Applications de molécules en champs

Ainsi il existe des mécanismes végétaux pour détourner l'azote efficacement utilisé par les microorganismes au profit des plantes. Bien qu'aucune application commerciale n'ait été faite pour le BDI et le BNI, il existe des produits déjà utilisés en agriculture en application en champs capable de jouer un rôle d'inhibition du cycle de l'azote ou d'autres mécanismes, afin d'améliorer la productivité végétale.

5.1. Application des retardateurs de la nitrification

Le 3,4-Diméthylpyrazole phosphate (DMPP) et le dicyandiamide (DCD) sont des molécules chimiques (Figure 14) issues de recherches démarrées dans les années 1950 afin de bloquer ou retarder le phénomène de nitrification (Gilsanz et al., 2016).

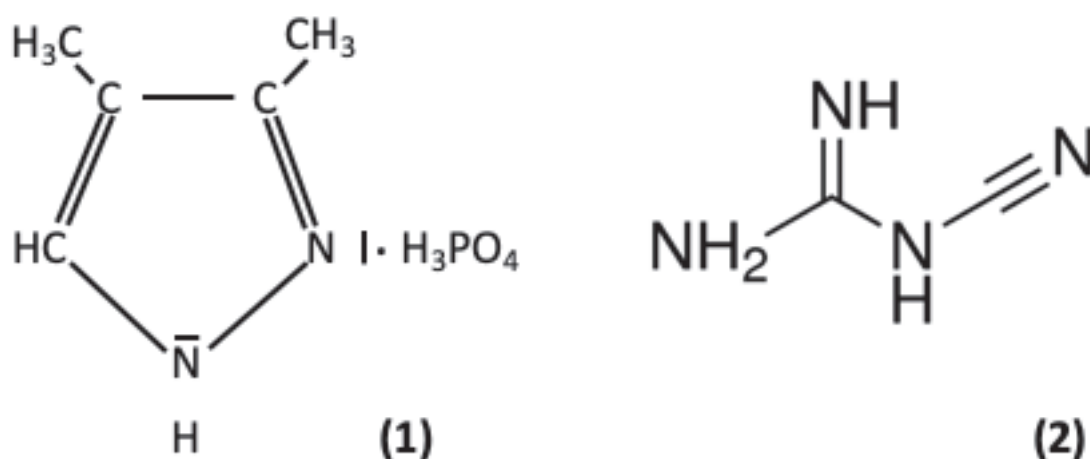


Figure 14 : Représentation des molécules de (1) 3,4-Diméthylpyrazole phosphate (DMPP) de (2) dicyandiamide (DCD). Modifiée d'après Marsden et al. (2015) & Zerulla et al. (2001)

Ces molécules peuvent ainsi (i) empêcher la conversion d'ammonium du sol en nitrate, plus facilement assimilable par les microorganismes ou sujet aux pertes par lessivage, et (ii) augmenter l'efficacité des engrais à base d'ammonium pour la productivité des cultures (Abalos et al., 2014). Le DMPP et le DCD sont tous deux des inhibiteurs spécifiques de l'ammonium monooxygénase (AMO), mais le DMPP désactive efficacement l'AMO à des doses d'application qui sont inférieures à celles du DCD (Pasda et al., 2001; Weiske et al., 2001). L'application de ces produits se fait en grande majorité en mélange avec les engrais appliqués en champs. Ces granulés sont en général composés de 20 à 50% de la molécule, le reste étant

des composés azotés tels que l'urée ou l'ammonitrate, et leurs applications se fait de façon conventionnelle sur sol dans des quantités qui dépendent des cultures mais toujours en deçà des quantités d'engrais conventionnels (Akiyama et al., 2010).

De plus, le DCD est trop coûteux pour une application en champs rentable d'où la prépondérance du DMPP dans cette pratique en agriculture (Zerulla et al., 2001). Le DMPP est efficace à des taux très faibles. Une application de 0,5 à 1,5 kg de DMPP ha⁻¹ (en fonction de la quantité d'azote appliquée) suffit dans les conditions de champ pour assurer la sécurité des cultures et inhiber la nitrification sur une période de 4 à 10 semaines (Zerulla et al., 2001). L'inhibition de la nitrification peut aller jusqu'à 60 % pour le DMPP (Merino et al., 2005) et 90 % pour le DCD (Delgado and Mosier, 1996) et peut augmenter les rendements agricoles jusqu'à 40 % (Fangueiro et al., 2009).

Il existe de nombreuses études sur le terrain qui évaluent l'effet des inhibiteurs de nitrification sur les émissions de N₂O à différents endroits et dans différentes conditions climatiques et pédologiques, et la plupart d'entre elles ont conclu que l'ajout d'un inhibiteur de nitrification réduit les émissions de N₂O provenant des engrais synthétiques et des épandages d'origine animale (Di and Cameron, 2012; Meijide et al., 2007; Pathak et al., 2002).

5.2. Application de biostimulant

Le terme « biostimulant » réunit toutes substances bénéfiques pour les plantes, à l'exclusion des nutriments, des pesticides et des amendements pour les sols (du Jardin, 2015). Par la suite, il s'est avéré que les actions positives des biostimulants chimiques (d'origines naturelle ou synthétique) comme la stimulation de la croissance, la modulation du développement et de la tolérance accrue au stress environnemental, pouvaient également être apportées par les bactéries et les champignons (du Jardin, 2012). Face à cette difficulté de définir ce qu'est un biostimulant et d'apporter des législations viables pour une démocratisation des pratiques, les entreprises du secteur ont créé des associations, comme « *European Biostimulants Industry Council* » (EBIC) en Europe et la « *Biostimulant Coalition* » aux États-Unis, dialoguant avec les conseils scientifiques (Traon et al., 2014). Avant 2016 et le projet de loi applicable courant 2018, il n'existait aucune définition légale ou réglementaire des biostimulants végétaux dans le monde, y compris dans l'Union européenne et aux États-Unis (La Torre et al., 2016; Yakhin et al., 2017). Cette loi de 2016 définit l'autorisation d'utiliser et d'appliquer à des fins agricoles des produits biostimulants d'origines naturelles du moment où leurs

composants aient été listés par l'Union européenne. Cette situation empêchait alors l'établissement d'une liste détaillée et la catégorisation des substances et des microorganismes visés par le concept. Malgré cela, certaines grandes catégories sont reconnues par les scientifiques (du Jardin, 2015): comme **les acides humiques** (du Jardin, 2012), les produits issus **d'algues marines** (Craigie, 2011; Craigie et al., 2007; Khan et al., 2009), **les produits issus des protéines ou autres composés contenant de l'azote** (Calvo et al., 2014; du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015), **les composés allélochimiques** (Seiber et al., 2014), **les biopolymères**, **les composés inorganiques** (Katiyar et al., 2015; Pilon-Smits et al., 2009) ainsi que **certains champignons et bactéries** (Bonfante and Genre, 2010; Johnson and Graham, 2013; Ruzzi and Aroca, 2015). Bien que l'industrie du biostimulant soit en constante accélération (du Jardin, 2015), la plupart des applications en champs dépendent des recherches scientifiques approuvant la viabilité économique et la productivité agricole gagnée *via* ces produits.

5.3. Méthodes d'applications en champs des biostimulants

Les molécules ou organismes vivants classifiés dans les biostimulants sont extrêmement variés tout comme les cultures sur lesquelles ils sont amendés. Il est donc naturel que les méthodes d'applications soient également très diversifiées comme :

- (1) **La pulvérisation sur feuille** : comme Ertani et al. (2014) appliquant les biostimulants sous forme d'hydrolysate de luzerne et d'extrait de raisin rouge par pulvérisation sur les feuilles (avant la floraison) à partir du produit dilué à des concentrations allant de 25 à 100 ml.l⁻¹ à hauteur de 4,5 ml par feuille avant la floraison, augmentant ainsi l'assimilation de l'azote et la croissance des poivrons jaunes (*Capsicum chinensis*). Ou alors Zodape et al. (2011) qui appliquent une solution à 5% de sève d'algues (*Kappaphycus alvarezii*) sur les feuilles de tomates à deux reprises (7 jours avant et après la floraison) induisant jusqu'à 60% d'augmentation de la taille des fruits de tomates. Ou encore l'étude de Tian et al. (2015) qui applique un biostimulant issu de la fermentation microbienne de grains de céréales sur feuille de tournesols mais en baignant les feuilles pendant 10 secondes dans 250 ml de la solution de biofertilisant, augmentant ainsi la nutrition de zinc de la plante (cette méthode est toutefois inapplicable sur le terrain).

- (2) **L'application au sol** : [Michalak et al. \(2016\)](#) décrivent l'effet d'une application en champs d'une solution à base d'algues comme la spiruline ou d'algues de la mer baltique sur sol sur une culture de blé. D'après de précédentes études de [Chojnacka et al. \(2014\)](#), 100 g d'extrait d'algues ont été mis en solution dans un litre d'eau et appliqués en différentes concentrations par pulvérisation sur la culture pendant sa phase végétative. Les concentrations étaient de 1,0, 1,5 et 1,8 L.ha⁻¹. A partir de 1,5 L.ha⁻¹ l'étude observe une augmentation de la longueur de tige, du nombre d'épis et de grains.
- (3) **L'application foliaire et au sol** : certaines études comme [Lucini et al. \(2015\)](#) mélangent les deux méthodes sur une culture de laitue. En effet, dans cette étude ils utilisent des biostimulants à base d'hydrolysats de protéines végétales, pulvérisés en solution de 2,5 ml.L⁻¹ sur les feuilles et appliqués en sol à la même concentration. L'application du biostimulant sur les racines et les feuilles augmente le rendement frais, la biomasse sèche et le poids sec de la laitue. De la même manière, [Fathy et al. \(2010\)](#) applique sur des cultures d'abricots des biostimulants sur feuilles et en sol. Les traitements foliaires étaient de 0,9 à 15 ml par cm³ et au sol dans les mêmes concentrations dans 3 L de solutions appliquées à la base des arbres en Actosol (un biostimulant commercial à base d'acide humique à 2,9%). L'application a eu lieu toutes les semaines entre la floraison et la montée en fruit et a induit une augmentation de la longueur des arbustes, du nombre et de la surface de feuilles ainsi que de la qualité et du nombre de fruits.
- (4) **L'incorporation dans la solution nutritive** : [Parađiković et al. \(2011\)](#) et [Vernieri et al. \(2002\)](#) ont travaillé respectivement le poivron jaune (*Capsicum annuum* L.) et la laitue de type roquette (*Eruca sativa* Mill.) avec l'application de biostimulant commercial riche en acide aminé issu de plantes. Son application a été apportée avec la solution nutritive lors de l'arrosage en sol avec différentes concentrations de 0,003 % à 0,30 % de la solution nutritive conventionnelle avec des engrais azotés standards pour ce type de culture. L'application s'est faite au stade de croissance le plus important de ces plantes d'après les recommandations du commercial. Les rendements ont pu être augmentés de près de 50 % à certaines concentrations.
- (5) **Application sur les plantules** : [Vernieri et al. \(2002\)](#) propose lui une application d'un biostimulant commercial Radifarm issu d'extrait de plantes riches en polysaccharides,

acides aminés et bêtaïne en pulvérisant le produit à différentes concentrations (125, 250 et 500 ml.hl⁻¹) sur les plantules encore en plaque avant leurs mises en terre. Ainsi les concentrations efficaces dépendent de la plante, 125 ml.hl⁻¹ est efficace pour des rendements améliorés de laitue alors qu'il faut 250 ml.hl⁻¹ pour observer un effet significatif sur la tomate.

- (6) **L'inoculation** : [Gholami et al. \(2009\)](#) ont inoculé des souches de PGPR sur des semences de maïs (*Zea mays*). Six souches bactériennes ont été utilisées telles que : la souche R-168 de *Pseudomonas putida*, la souche R-93 de *Pseudomonas fluorescens*, la souche DSM 50090 de *P. fluorescens*, *P. putida* DSM291, *Agrobacterium lipoferum* DSM 1691 et *Azospirillum brasilense* DSM 1690. Les semences de maïs (SC 647) ont été stérilisées en surface avec 0,02 % de sodium pendant 2 minutes et rincées abondamment dans de l'eau stérile, puis inoculées par une suspension bactérienne de 10⁸ cfu.ml⁻¹. Les auteurs ont ainsi montré que les souches de PGPR inoculées avaient des effets sur la germination et la vigueur du maïs en champs. De même, l'étude de [Hijri \(2016\)](#) montre qu'une inoculation d'une solution de mycorhize (*Glomus irregulare*) à une concentration de 10 500 spores par ml sur des graines de pommes de terres entraînait une augmentation de 10 % des rendements en champs.

Il faut par ailleurs noter que d'après DunhamTrimmer LLC (Biological Control Industry), principale société d'étude sur l'agriculture biologique, le marché mondial des biostimulants représentait environ 100 millions de dollars en 1993 et plus de 3 milliards en 2016 et devrait atteindre 5 milliards en 2020 d'après les prévisions. Bien qu'il soit extrêmement difficile d'estimer une quantité appliquée sur les cultures en vue des différents types de biostimulants, des moyens d'applications et des méthodes d'utilisation, le marché des biostimulants représente environ 5 à 6 % de l'utilisation en agriculture. Cependant, malgré cette prise de conscience écologique et cette volonté de changer les intrants dans le sol, pour l'instant seulement 34 % des biostimulants sont utilisés sans apport conventionnel complémentaire (source unigrains d'après Union des industries de la fertilisation (UNIFA, 2014)). Mais ce marché est dans une dynamique d'augmentation de 12 % sur les 5 dernières années.

6. Conclusions et objectifs de la thèse

Ainsi, il existe un très grand vivier de possibilités pour palier ou diminuer les apports d'engrais que ce soit en termes de produits, en termes d'applications ou en termes de types de cultures traitées. Les résultats présentés précédemment ont tous été basés sur des études, tests et affinages scientifiques afin d'optimiser au mieux l'application en champs.

Les molécules d'origine végétale peuvent inhiber des étapes du cycle de l'azote et pourraient rendre disponible de l'azote bénéfique pour la plante. C'est le cas essentiellement du BDI qui permet de rendre disponible le nitrate pour les plantes. Cependant, toutes les études réalisées jusqu'alors sur l'inhibition biologique de la dénitrification ont été faites en serre *ou in vitro*, ne sont que théoriques pour un intérêt agricole, et n'ont pas clairement montré un retour positif sur les traits morphologiques des plantes.

C'est pourquoi, lors de ce doctorat, nous avons pour objectif de démontrer que le nitrate rendu disponible suite au phénomène du BDI qu'une plante exerce *via* la production de procyanidines ou suite à l'ajout dans le sol de procyanidines est profitable à la plante pour sa croissance. Cet objectif se décline en deux parties :

- Partie 1 qui consistait à mettre en évidence *via* l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans la production des procyanidines ou surproduisant les procyanidines, un retour vers la plante de l'azote détourné suite au BDI. Cette partie a été réalisée en serre (Chapitre 1).
- Partie 2 qui consistait à tester l'effet de l'application de procyanidines exogènes en champs sur la croissance de cultures d'intérêt économique. Cette partie a été réalisée en champs au niveau de la station expérimentale la Serail (Brindas Rhône France). Trois essais ont été menés : (1) culture de laitue afin de démontrer si l'ajout des procyanidines en champs induit une inhibition de la dénitrification et si cette dernière est profitable pour la croissance des laitues *via* la disponibilité du nitrate (Chapitre 2). (2) culture de laitue sur deux sols présentant des textures différentes afin de tester le lien entre texture du sol et effet des procyanidines (Chapitre 3). (3) Enfin le dernier essai a été effectué sur une culture de céleri qui est connue pour être longue et nécessitant beaucoup de nitrates, afin de tester si l'apport des procyanidines commerciales en champs sur une telle culture permet d'augmenter le rendement ou d'obtenir un rendement proche de celui des cultures avec apport d'engrais (Chapitre 4).

CHAPITRE 1.

**Démonstration d'un retour vers la plante de l'azote
détourné suite au BDI avec le modèle *A. thaliana***

Démonstration d'un retour vers la plante de l'azote détourné suite au BDI avec le modèle *A. thaliana*

Il a été démontré par [Achouak et al. \(2019\)](#) qu'au niveau du sol adhérent aux racines d'*A. thaliana*, il y avait une activité de dénitrification significativement moindre qu'au niveau du sol non planté et des sol adhérent aux racines de *Brassica napus* (Colza, *Brassicaceae* de la même famille que *A. thaliana*), de *Triticum aestivum* et de *Medicago truncatula* ([Figure 15](#)) ([Achouak et al., 2019](#)).

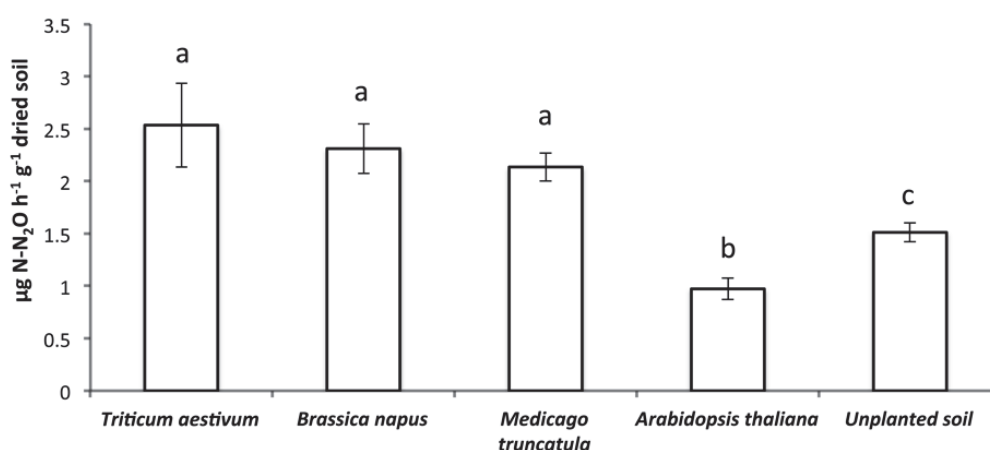


Figure 15 : Activité de dénitrification ($\mu\text{g of N-KNO}_3 \text{ g}^{-1}$ of dried soil) au niveau du sol adhérent aux racines de *Triticum aestivum*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* et du sol non planté. Les lettres indiquent les différences de moyennes (test de ANOVA, $\alpha < 0,05$). Les barres verticales indiquent les erreurs standards. D'après Achouak et al., (2019).

De plus, certaines publications font état d'une production de procyanidines chez *A. thaliana* ([Debeaujon et al., 2000](#); [Dixon et al., 2005](#); [Routaboul et al., 2006](#)) et potentiellement dans la racine ([Abrahams et al., 2002](#)). L'activité de dénitrification, plus faible dans le sol adhérent aux racines d'*A. thaliana* pourrait donc résulter d'un phénomène de BDI.

De plus, cette plante étant un modèle très utilisé en biologie végétale, elle possède un éventail très important de mutants à disposition. Ainsi l'utilisation d'un mutant non-exprimant de

procyanidines, en comparaison avec le type sauvage potentiellement producteur de procyanidines au niveau racinaire, permettrait d'avoir deux plantes ayant la capacité ou non d'opérer la stratégie du BDI. L'utilisation d'*A. thaliana* et de mutants non-producteurs de procyanidines permettra de déterminer si oui ou non il y a un retour à la plante de l'azote non consommé par les communautés dénitrifiantes suite à l'action des procyanidines ; et cela pourrait s'observer sur les traits morphologiques, la teneur en azote des plants et/ou la vitesse de développement.

1. Identification de la voie métabolique des procyanidines chez *A. thaliana* et sélection des mutants

La première étape du travail fut alors d'identifier la voie métabolique des proanthocyanidines (famille des procyanidines) chez *A. thaliana* et les facteurs de transcriptions permettant sa formation. La voie métabolique des proanthocyanidines se trouvent en aval de la voie des anthocyanes (Abrahams et al., 2002). La famille des anthocyanes sont des métabolites secondaires composés d'un très grand nombre de molécules, responsables entre autres de la coloration des fruits rouges (Tanaka et al., 2008), mais aussi d'un rôle dans la pollinisation et la dispersion des graines (Miller et al., 2011) ou alors dans la protection des plantes vis-à-vis d'un stress environnemental (Gould, 2004; Lev-Yadun and Gould, 2008).

Plusieurs facteurs de transcriptions rentrent en jeu afin de métaboliser à partir d'anthocyanes, des flavan-3-ols (dont font parties les catéchines et épicatechines : monomères des procyanidines), et de polymériser ces derniers en procyanidines de différents types (dimères, trimères, etc.) (Figure 16).

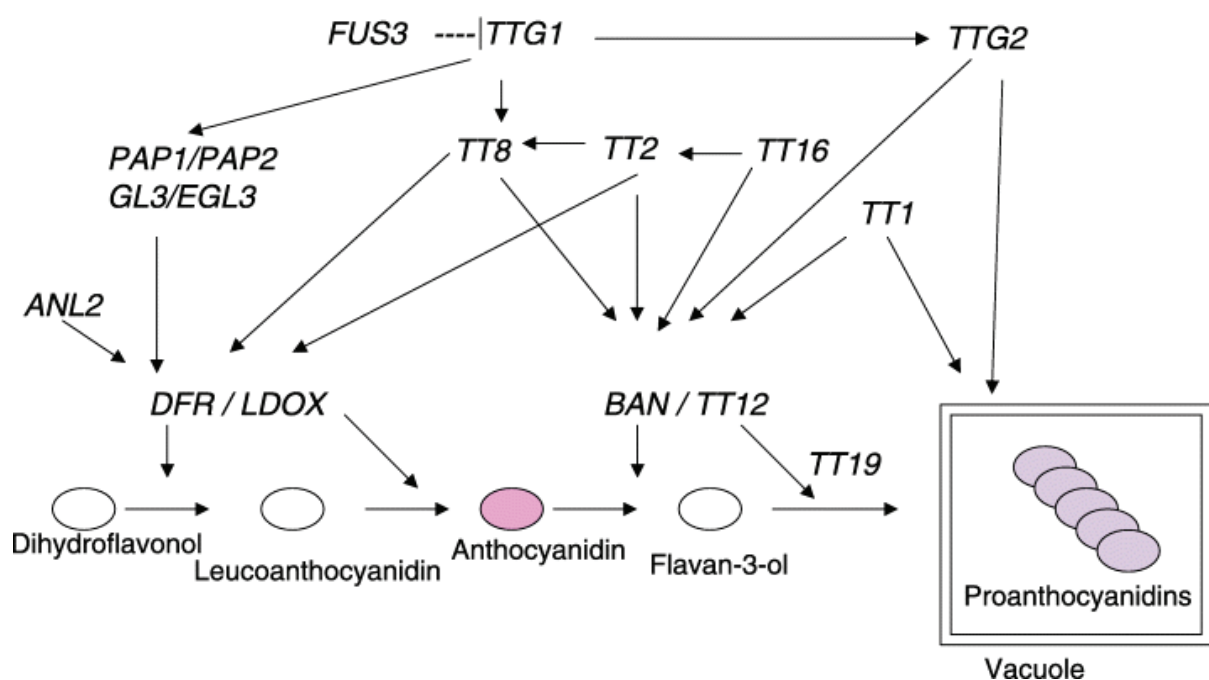


Figure 16 : Voie métabolique des proanthocyanidines chez *A. thaliana* (Abrahams, 2002). Différents facteurs de transcription rentrent en compte dans la transformation des dihydroflavonols en Leucoanthocyanidines puis en anthocyanidines, puis en Flavan-3-ols pour enfin se polymériser en molécules de la famille des proanthocyanidines au sein des vacuoles des cellules végétales.

D'après la littérature, il existe plusieurs mutants affectés sur différents facteurs de transcription et au niveau de plusieurs niveaux de cette voie métabolique. Ces facteurs de transcription étant impliqués dans plusieurs rôles, il est préférable de s'intéresser aux mutants des facteurs de transcription agissant au plus tard dans la formation de proanthocyanidines, afin d'éviter de perturber d'autres rôles importants dans la plante. Ainsi, les mutants qui paraissent les moins impactant étaient ceux affectés au niveau des facteurs de transcriptions TT12 (Debeaujon et al., 2003), TT19 (Kitamura et al., 2004), TT2 (Baudry et al., 2004) et TT8 (Nesi et al., 2000). Les études citées relatent uniquement des recherches en lien avec la présence ou non en procyanidines au niveau des graines, mais aucunement dans un contexte racinaire.

Plusieurs mutants par facteurs existent en fonction de la position de la mutation au niveau du gène (Abrahams, 2002). Le choix des mutants et la commande des graines (fournisseur NASC) ont été réalisés avec l'aide de l'équipe Morphogénèse florale du laboratoire Reproduction et Développement des Plantes (ENS Lyon). 6 mutants affectés au niveau des facteurs de transcriptions TT2, TT12, TT8 et TT19 ont été sélectionnés. Ceux-ci, une fois à notre disposition, ont été mis en culture pour l'obtention de *backcross* (croisement permettant de

contre-sélectionner les mutations récessives non voulues) et pour vérifier que les mutations d'intérêts ne soient pas parasitées par d'autres. Ainsi, des graines de 6 mutants ayant subi une sélection après *backcross* ont été produites à la serre, et les graines sont dorénavant disponibles (les 6 mutants sont mutés sur TT2, TT12, TT8 ou TT19).

Il est, de plus, intéressant de noter que d'après la littérature, il existe une rétro régulation de la voie des anthocyanes (Rubin et al., 2009). En effet, le facteur de transcription LBD régule l'expression de PAP1 en fonction de la concentration du nitrate présent dans le sol (voir sur la Figure 15). Plus le sol est concentré en nitrate, plus le facteur LBD réprime l'expression de PAP1 et *in-fine* la métabolisation de procyanidines. Ainsi, d'après Rubin et al. (2009) la voie des anthocyanes (et par prolongement celle des procyanidines) est optimale lorsque le milieu est pauvre en nitrate et que le facteur LBD n'est pas exprimé.

2. Mise en évidence d'une production racinaire de procyanidines chez *A. thaliana*

La première expérimentation consistait à mettre en évidence une production racinaire de procyanidines chez *A. thaliana* et par conséquent l'existence d'un BDI lié à ces molécules.

Dans un premier temps, nous avons mis en culture des *A. thaliana* de type sauvage Columbia-0 (Col-0) sur un sol de prairie en phytotron afin d'obtenir des racines pour effectuer une extraction et une analyse en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), dans le but de déterminer la présence ou non de procyanidines.

D'après la littérature, *A. thaliana* sur un terreau optimal atteint son stade de floraison au bout de 6 semaines, or nous avons constaté qu'*A. thaliana* mettait plus de temps à atteindre ce stade sur ce sol (16 à 18 semaines de croissance). L'utilisation d'un sol de prairie est préférable dans notre cas, car celui-ci est plus proche des conditions de terrain que nous pouvons rencontrer et les communautés microbiennes dénitrifiantes y sont mieux représentées. Ce sol était pauvre en nitrate ($5 \mu\text{g N-NO}_3.\text{g}^{-1}$ sol sec) pour respecter l'hypothèse de Rubin et al. (2009) disant que la voie des anthocyanes était plus efficace dans un milieu pauvre en nitrate. Les plantules d'*A. thaliana* ont été cultivées dans des phytotrons à des conditions de 70 % d'humidité, de 22°C et avec une luminosité de 8 h par jour, afin de favoriser la phase végétative et avoir un maximum de matériel biologique pour l'extraction des métabolites secondaires.

L'un des problèmes rencontrés fut la faible quantité de masse racinaire présente chez cette plante. Il a donc fallu faire pousser un nombre relativement important de plants afin de pooler

les différentes parties racinaires, pour avoir une concentration suffisante pour une détection en HPLC (Graham, 1998; Adamson et al., 1999).

Bien que le pool d'une quinzaine de systèmes racinaires semblait acceptable pour avoir un poids extrait suffisant pour une détection, les résultats ne nous ont pas permis de déterminer une production ou non de procyanidines chez *A. thaliana* en HPLC. Dans le cas où *A. thaliana* ferait du BDI et devrait produire des procyanidines, il est possible que le stade de développement des plantes utilisé en HPLC ne correspond pas au stade de production de procyanidines ou que la durée de jour utilisée favorisant la phase végétative ne soit pas optimale à la production (Simpson and Dean, 2002). Il est aussi possible que la qualité du sol (bien que considéré comme pauvre en nitrate) ne soit pas optimale pour la production de procyanidines (Baudry et al., 2004).

C'est pourquoi une expérimentation plus importante a été opérée sur trois sols différents : un sol riche en nitrate ($80 \mu\text{g N-NO}_3.\text{g}^{-1}$ sol sec), un sol pauvre en nitrate ($5 \mu\text{g N-NO}_3.\text{g}^{-1}$ sol sec) et du terreau. Un nombre important d'*A. thaliana* a été mis en culture et chaque semaine, un nombre suffisant a été prélevé pour avoir une quantité suffisante pour l'extraction et l'analyse en HPLC. Encore une fois, sur les racines prélevées de la première semaine à la huitième semaine, il n'y a eu aucune mise en évidence de production de procyanidines au niveau des racines d'*A. thaliana*.

En parallèle à ces expérimentations, des tests colorimétriques ont été effectués sur les racines de la même expérimentation, prélevées de façon hebdomadaire. Ces tests ont été faits avec un colorant appelé Dmac (N,N Diméthylacétamide) (Prior et al., 2010), colorant les proanthocyanidines dans une couleur violette, mais aussi les monomères de type catéchine. Bien que non spécifique aux procyanidines mais davantage à l'ensemble de la famille des proanthocyanidines, son utilisation peut être un premier indicateur afin de déterminer le stade de production des procyanidines au niveau racinaire.

Nous avons alors affiné le protocole proposé par Prior et al., 2010, qui utilise une solution trop acide pour utilisation *in-vivo*. Nous avons donc mis au point une solution moins acide qui a été testée pour une application directement sur racines après extraction du sol. C'est de cette manière, qu'à partir de la première semaine de culture, des racines juvéniles ont été récoltées et colorées au Dmac. Celles-ci furent colorées en violet (Figure 17) de la deuxième à la fin de la troisième semaine de culture d'*A. thaliana*.



Figure 17 : Photographie de racines juvéniles d'*A. thaliana* (2 semaines de croissance) colorées à gauche à l'éthanol et à droite au Dmac.

Cette coloration peut être due à la non-spécificité du colorant Dmac, or on sait que celui-ci peut majoritairement colorer les monomères de procyanidines : catéchines, mais nous n'avons pas observé dans les chromatographes la présence de cette molécule. Bien que la méthode de HPLC mise au point permette de détecter dans un matériel végétal des procyanidines, la coloration n'est pas obligatoirement contradictoire avec les résultats d'HPLC. Les procyanidines peuvent éventuellement être rapidement exsudées par les racines, d'où la coloration sur celles-ci, mais aussi rapidement diffusées dans le sol et ne pas être détectées en HPLC.

C'est pourquoi en parallèle, nous avons essayé de déterminer la présence dans les sols de procyanidines. Pour se faire, nous avons récupéré l'eau interstitielle sur des sols plantés avec *A. thaliana* et des sols non plantés auxquels nous avons rajouté des procyanidines comme contrôle. Ceux-ci ont été récoltés chaque semaine de la croissance des plants pendant 8 semaines jusqu'à la montée en floraison, les *A. thaliana* poussaient alors en jours longs de 16 h de luminosité, 22°C et 70 % d'humidité.

Pour se faire, deux techniques ont été utilisées sur des lots de pots différents : (1) des rhizons (Seeberg-Elverfeldt et al., 2005) qui sont des petites tiges en silice avec des petits pores que l'on insère dans le sol afin de filtrer la solution du sol et de récupérer les molécules dans celle-ci (Figure 18). (2) la récupération de l'eau lessivée à travers les pots. Ensuite par extraction puis séparation des différentes fractions de la solution récupérée, nous avons obtenu une solution du sol contenant la majorité des molécules présentes.

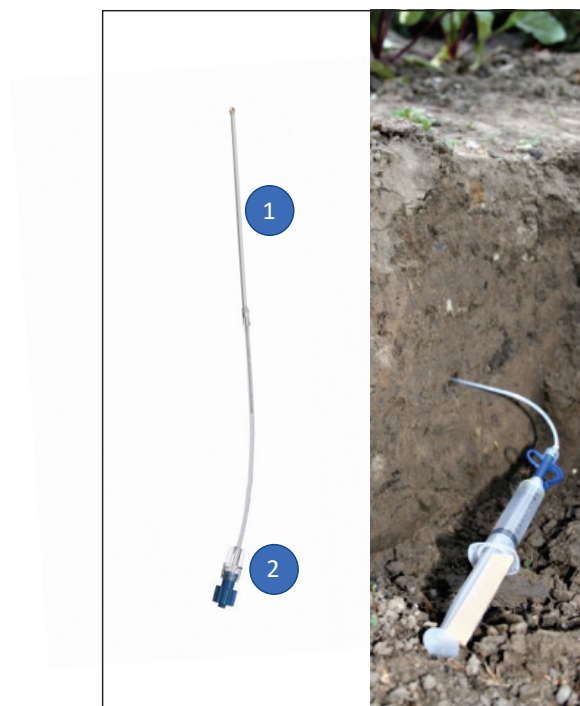


Figure 18 : Photographie à gauche d'un rhizon, avec en 1/ la tige en silice permettant la filtration de solution du sol, et en 2/ la partie permettant d'accueillir la seringue, qui une fois ouverte sera le moyen de pression pour extraire l'eau du sol. Et à droite la photographie en champs d'un rhizon appliqué dans le sol.

Ces solutions ont été analysées en HPLC, toutefois, les procyanidines n'ont pas été détectées. Il est important de noter qu'en raison de la présence d'autres molécules de façon majoritaire, telles que des sucres ou des protéines, les résultats en chromatographie en sont parasités, ce qui a empêché d'analyser de façon claire les chromatogrammes. Toutefois, cela ne signifie pas qu'il y ait absence, mais que l'ensemble des composants du sol cache d'éventuelles traces de procyanidines ou que les procyanidines ont été adsorbées sur des particules de sols comme les argiles, les rendant non extractibles (Halvorson et al., 2011).

3. Mise en évidence d'une réponse à un apport en procyanidines chez *A. thaliana*

En absence de démonstration d'une production de procyanidines chez *A. thaliana*, nous avons voulu savoir si l'addition de procyanidines en sol permettrait à *A. thaliana* de mieux pousser (traits morphologiques améliorés) suite au BDI.

Ainsi des *A. thaliana* de type sauvage (Col-0) ont été mises en conditions contrôlées, c'est-à-dire dans des phytotrons avec 16 h de jour/ 8 h de nuit, 70 % d'humidité, maintenus à 22°C dans des pots dont le sol a été toujours maintenu à la même humidité. Et ce, dans des sols où des procyanidines de type commercial, extrait de raisins de la société Laffort contenant

principalement des proanthocyanidines, ont été mises à différentes concentrations exprimées en mg de procyanidines par g de sol sec (0 ; 0,05 mg. g⁻¹; 0,1 mg.g⁻¹; 0,5 mg.g⁻¹ et 1 mg.g⁻¹ et le sol non planté et non amendé).

Ces concentrations se basent sur celles utilisées par [Bardon et al., \(2016b\)](#) et qui ont un effet sur les communautés microbiennes dénitrifiantes testées. L'apport a été fait une semaine après la germination des graines, au moment de l'arrosage dans une solution d'eau déminéralisée en volume permettant d'atteindre la capacité aux champs du sol.

Après 16 semaines de croissance, les plantes ont été récoltées et le sol adhérent aux racines a été récupéré, la masse aérienne ainsi que la surface foliaire ont été mesurées. L'activité microbienne potentielle de dénitrification (DEA, Denitrification Enzyme activity) a été mesurée au niveau du sol adhérent aux racines des *A. thaliana* en chromatographie gazeuse ([Figure 19](#)). Brièvement, cette méthode consiste à mettre les communautés microbiennes du sol dans des conditions optimales pour induire l'activité de dénitrification, c'est-à-dire en anaérobie, en condition non limitante en carbone frais et en nitrate.

Les résultats obtenus montrent que l'activité de dénitrification des communautés microbiennes colonisant le sol adhérent aux racines des plantes non amendées est au même niveau que celle obtenue à partir du sol nu ([Figure 19](#)). Cependant, suite à l'ajout des procyanidines aux concentrations de 0,05 et 0,1 mg.g⁻¹ de sol sec, il y avait moins d'activités de dénitrification que dans le sol adhérent aux racines d'*A. thaliana* non amendées.

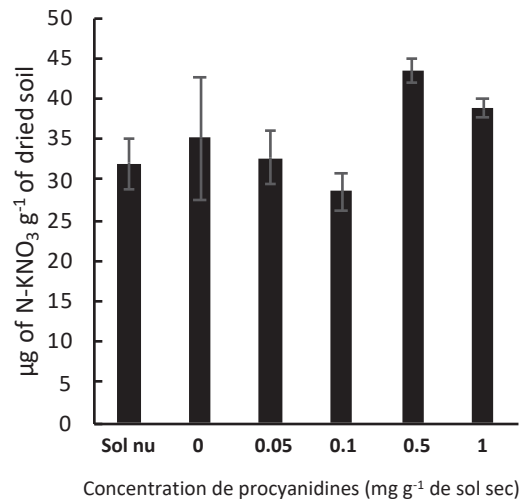


Figure 19 : Activité de dénitrification (DEA) (en μg de $\text{N-KNO}_3 \text{ g}^{-1}$ de sol sec) du sol non planté et du sol adhérent aux racines d'*A. thaliana* (Col-0) en fonction des concentrations en procyanidines appliquées au sol (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg g^{-1} de sol sec). Les barres verticales indiquent les erreurs standards.

En faisant le rapport de l'activité de dénitrification des sols adhérent aux racines d' *A. thaliana* non amendées avec celles amendées, nous obtenons un pourcentage d'inhibition qui représente alors le BDI. Dans ce cas, il y a un BDI supérieur de 7 % et de 18,8 % pour les concentrations respectives de 0,05 et 0,1 mg de procyanidines. g^{-1} de sol sec (Figure 20). Bien que ces résultats présentent des tendances encourageantes, ils n'ont montré aucune différence statistique avec le test de Kruskal-Wallis.

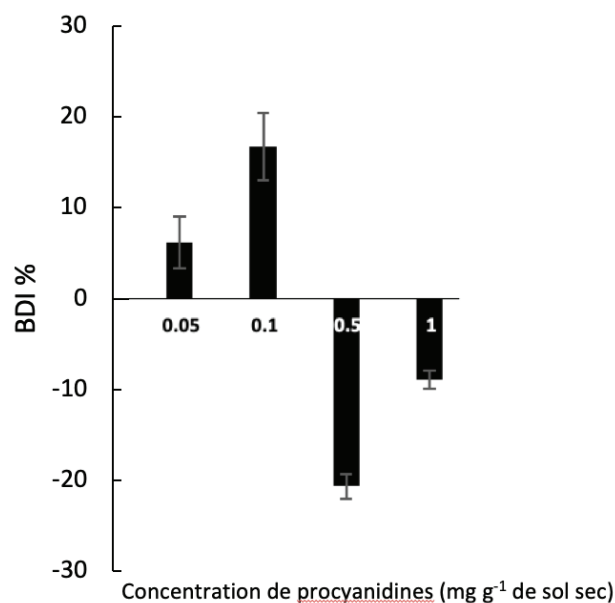


Figure 20 : BDI en % calculé par rapport à l'activité de dénitrification au niveau du sol adhérent aux racines d'*A. thaliana* sans amendement en procyanidines (COL 0). BDI obtenu pour les concentrations en procyanidines appliquées au sol planté avec *A. thaliana* (0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg g⁻¹ de sol sec). Les barres verticales indiquent les erreurs standards.

L'inhibition de la dénitrification de 18,8%, observée pour le sol adhérent aux racines d'*A. thaliana* à une concentration de 0,05 et 0,1 mg de procyanidines par gramme de sol sec, corrèle avec un poids sec plus important que pour les *A. thaliana* non plantées (Figure 21). Bien que ces résultats ne soient pas significatifs statistiquement, ils permettent de dégager deux informations : (1) qu'en serre l'ajout de procyanidines permet de modifier certains traits d'*A. thaliana* comme l'avait démontré Bardon et al. (2017) avec *Fallopia sp.* et (2) certaines concentrations semblent efficaces et montrent un effet sur *A. thaliana*.

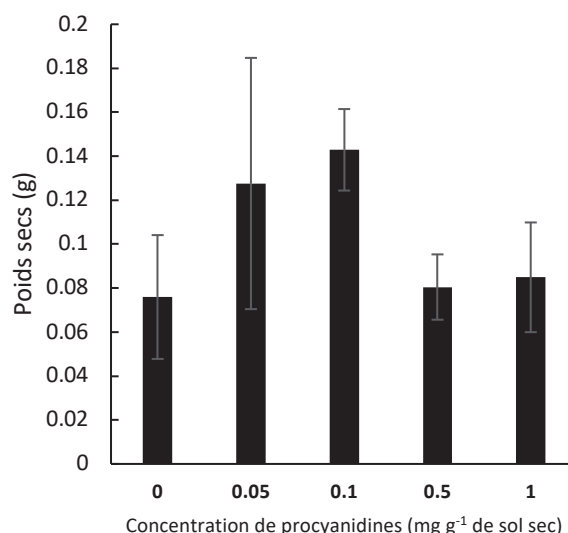


Figure 21 : Poids secs des plantes d'*A. thaliana* en fonction des concentrations en procyanidines appliquées au sol (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg g⁻¹ de sol sec). Les barres verticales indiquent les erreurs standards.

4. Perspectives

Dans cette partie de la thèse, nous nous sommes heurtés à la difficulté de mettre en évidence la production de procyanidines au niveau des racines chez *A. thaliana*. La réponse positive de la coloration au Dmac peut potentiellement signifier qu'*a minima* à un certain stade de croissance, il y aurait présence de procyanidines sur la surface des racines d'*A. thaliana*, qui aurait pu être trop faible pour une détection en HPLC. Cependant, bien que la voie métabolique soit présente chez cette espèce et qu'il y ait une diminution de l'activité de dénitrification au niveau de son sol adhérent aux racines, on ne peut pas exclure que cela soit dû à d'autres molécules, comme observé par [Subbarao et al. \(2007\)](#) pour le phénomène de BNI qui est induit par plusieurs molécules. Il est vrai que pendant les analyses chromatographiques des *A. thaliana*, des molécules ont été détectées au niveau des racines, telles que le kaempferol qui est un flavonoïde proche des procyanidines ([Calderon-Montano et al., 2011](#)) et pourrait parmi d'autres être responsable lui aussi d'un BDI. Cette molécule, faute d'une source suffisante trouvée, n'a pas été testée pendant ce travail, mais il serait intéressant de tester son influence sur l'activité de dénitrification par un simple ajout dans le sol. Il est possible aussi que ce phénomène de baisse de l'activité de dénitrification ne soit pas un BDI et que *A. thaliana* modifie des facteurs abiotiques qui eux-mêmes jouent un rôle sur la

dénitrification, comme le pH ou le taux de matière organique, ou tout simplement l'aération du sol paramètre important dans la dénitrification ([Zumft, 1997](#)).

En absence de démonstration claire d'une production par le type sauvage de procyanidines, nous avons souhaité la construction d'un mutant d'*A. thaliana* qui surproduit les procyanidines au niveau racinaire et ceci avec l'aide de l'équipe Morphogénèse florale du laboratoire Reproduction et Développement des Plantes (ENS Lyon). L'activité de dénitrification aurait été évaluée chez ce mutant et comparée avec le type sauvage et les mutants non producteurs décrits précédemment. Faute de temps, la construction du mutant sur-producteur de procyanidines n'a pas été réalisée mais pourrait l'être dans un futur proche afin de répondre aux hypothèses initiales.

Enfin, l'ajout de procyanidines exogènes nous ont permis de mettre en évidence que *A. thaliana* pouvait répondre favorablement à un BDI. Les concentrations basées sur les travaux précédents de [Bardon et al. \(2016\)](#) se sont avérés efficaces en sol et nous ont servi de base pour les concentrations utilisées en champs (Chapitre 2).

CHAPITRE 2.

Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) au champ : une stratégie pour améliorer la nutrition et la croissance des laitues.



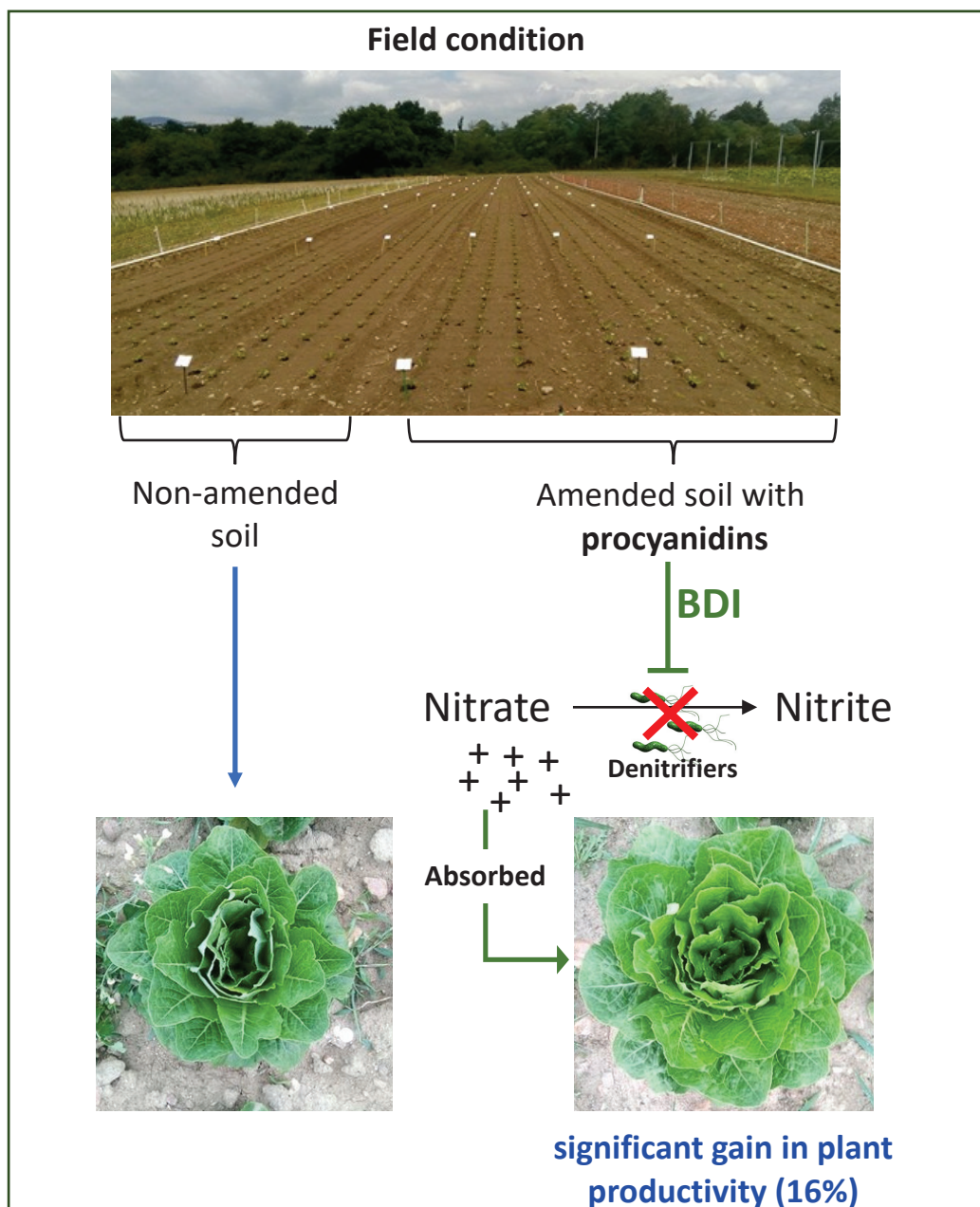
Figure 22 : Photographie des parcelles de la première expérimentation à la station expérimentale la Serail à Brindas sur des cultures de laitues. Expérimentation où différentes concentrations de procyanidines ont été appliquées sur une culture de laitue.

Lors du premier essai, nous avons, avec l'aide des connaissances de la station expérimentale la Serail à Brindas (69126 Rhône, France), choisi **de tester l'effet des procyanidines et donc du BDI en champ sur une culture de laitue**. La laitue (*Lactuca sativa* L.) est une plante très cultivée dans la région Rhône-Alpes (Bernadet, 2017). Elle présente un cycle de culture relativement court, de l'ordre de 6 semaines (De Vries, 1997). A partir des concentrations de procyanidines utilisées par Bardon et al., (2016b), démontrant une efficacité sur les communautés dénitrifiantes et celles utilisées lors du premier chapitre sur *A. thaliana*, il a été choisi plusieurs concentrations à apporter en champ : 8, 43, 87 et 210 kg.ha⁻¹. Ces procyanidines sous forme commerciale (du fournisseur LAFFORT) ont été appliquées en champ entre les rangs de laitues, par pulvérisation. L'ajout des procyanidines a été effectué, en accord avec les connaissances de la Serail, une semaine avant la date où la culture de laitue a le plus besoin de nitrate, ce qui correspond au moment où l'on ajoute conventionnellement de l'engrais. **Ainsi, l'hypothèse était de rendre disponible le nitrate via l'effet des procyanidines et donc du BDI au moment où la culture a un besoin en nitrate pour sa croissance.** La connaissance du moment le plus propice en besoin en nitrate pour la plante permet de réduire les problèmes liés à la présence du nitrate dans les sols tels que le lessivage ou les émissions de N₂O.

Durant l'expérimentation, nous avons mesuré le taux de nitrate au niveau du sol de toutes les parcelles (chromatographie ionique) et cela chaque semaine. Ceci nous a permis de suivre l'évolution du nitrate dans le sol et de décider du moment de l'ajout des procyanidines. Après 6 semaines de cultures, nous avons récolté les laitues sur lesquelles nous avons mesuré les masses et les teneurs en azote des parties aériennes et racinaires, ainsi que la ténacité des feuilles. Ensuite, au niveau du sol adhérent aux racines nous avons mesuré l'activité potentielle de dénitrification (chromatographie gazeuse) ainsi que les abondances des bactéries dénitrifiantes et de la communauté bactérienne totale (qPCR sur l'ARNr 16S, *nirK* et *nirS*).

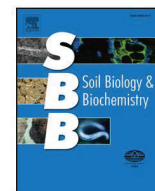
L'expérimentation nous a permis de démontrer que l'ajout de procyanidines en champ induit un BDI proportionnel à la dose, qui montre des effets efficaces à la dose la plus forte utilisée de 210 kg.ha⁻¹. En effet, l'ajout des procyanidines à 210 kg.ha⁻¹ a induit une augmentation du nitrate disponible dans le sol servant à l'augmentation de la productivité de la culture de laitue allant jusqu'à 16 % tout en conservant la qualité des feuilles que ce soit en termes biomécanique des feuilles ou de concentrations en azote dans les tissus.

Ce premier chapitre présente sous forme **d'un article publié en 2019 dans le journal Soil Biology and Biochemistry**, l'ensemble des résultats obtenus lors de cet essai, démontrant dès lors qu'une application en champs de procyanidines induit un BDI et une augmentation de la productivité végétale (modèle laitue).



Highlights

- Exogenously applied procyanidins in the field on lettuce crops does not modify lettuce physiology
- Procyanidins applied to soil with lettuce enhance BDI.
- Procyanidins induce counter-selection of denitrifiers
- Nitrate was more absorbed by lettuce treated with procyanidins
- Applied procyanidins lead to an increase in plant growth yields



Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: A strategy to improve plant nutrition and growth

William Galland^{a,b}, Florence Piola^b, Alexandre Burlet^c, Céline Mathieu^c, Mélisande Nardy^a,
Sophie Poussineau^b, Leslie Blazère^b, Jonathan Gervais^a, Sara Puijalon^b, Laurent Simon^b,
Feth el Zahar Haichar^{a,*}

^a Université de Lyon, UMR 5557 LEM, Université Lyon 1, CNRS, INRA 1418, F-69622, Villeurbanne Cedex, France

^b Université de Lyon, UMR5023 LEHNA, Université Lyon 1, CNRS, ENTPE, F-69622, Villeurbanne Cedex, France

^c Station d'Expérimentation Rhône-Alpes Information Légumes (SERAIL), 123 chemin du Finday Les Hoteaux, 69126, Brindas, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Biological denitrification inhibition
Field experiment
Nitrate
Denitrifiers
Lettuce
Rhizosphere
Plant traits
Productivity

ABSTRACT

Nitrogen is one of the factors limiting in plant growth, is naturally present in soils, and is mainly assimilated as nitrate and ammonium by plants. However, soil nitrate is also used by denitrifying bacteria, which reduce it to N₂O (a greenhouse gas) and N₂. Therefore, plants are in direct competition with these bacteria for the assimilation of nitrate. Recently, our research team has highlighted a strategy developed by some plants consisting of the production of secondary metabolites (procyanidins) that inhibit the denitrification activity of microbial communities in soils, referred to as BDI for biological denitrification inhibition (BDI). This strategy could make nitrate more available in the soil, which may then be used by plants for their growth. However, the extent to which procyanidins can affect plant growth and nutrition via BDI under field conditions has not yet been investigated. In this study, we tested the effect of procyanidins exogenously applied in the field on the nutrition and growth of cos or romaine lettuce crops (*Lactuca sativa*) nutrition and growth. Procyanidins were added to growing lettuce at 8, 42, 83 and 210 kg ha⁻¹. Soil denitrification enzyme activity (DEA), nitrate concentration, above- and below-ground lettuce traits and the abundance of total bacteria and denitrifiers were measured in lettuces treated or untreated with procyanidins. Our results showed that the addition of procyanidins in the field at 210 kg ha⁻¹ resulted in: (1) the inhibition of microbial denitrification activity and counter-selection of denitrifiers in the root-adhering soil of lettuce and (2) an increase in available nitrate and a significant gain in plant productivity. This study allowed us to propose for the short term the development of a more environmentally friendly method of sustainable agriculture by limiting fertilizer inputs, nitrogen losses from the soil, and greenhouse gas emissions while increasing plant growth and productivity.

1. Introduction

Nitrogen is one of the factors limiting plant growth (LeBauer and Treseder, 2008). It is the most important nutrient used to enhance agricultural yields. Thus, the development of plants depends on the processes linked to the nitrogen (N) cycle, which orchestrates the transformation of nitrogen into all its forms including ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻), the most plant-assimilable forms of nitrogen. The competition between plant roots and microorganisms for these two N forms is intense (Kuzuyakov and Xu, 2013). Microorganisms often out-compete plant roots, but some plant species are able to bypass this competition by taking control of the N in their rhizosphere through the production of secondary metabolites that inhibit N cycle processes

(Knops et al., 2002; Chapman et al., 2006; Subbarao et al., 2013; Bardon et al., 2016). For example, *Brachiaria humidicola*, by exuding some secondary metabolites (brachialactone), inhibits the nitrification process (Subbarao et al., 2009).

Nitrification is responsible for the conversion of ammonium to nitrate, which is rapidly converted into N₂O (a greenhouse gas) by denitrification and/or leached in soils (Di and Cameron, 2002). Denitrification, mostly carried out by bacteria, is the main form of nitrogen loss in most soils (Van der Salm et al., 2007; Radersma and Smit, 2011). Denitrification leads first to nitrate reduction, which is associated with two homologous enzymes, namely, transmembrane nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap), which are encoded by the *narG* and *napA* genes, respectively (the latter is not present in all

* Corresponding author.

E-mail address: zahar.haichar@univ-lyon1.fr (F.e.Z. Haichar).

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.009>

Received 18 December 2018; Received in revised form 9 June 2019; Accepted 12 June 2019

Available online 20 June 2019

0038-0717/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

denitrifiers). Depending on the microorganisms, nitrite reduction to nitric oxide (NO) involves two nitrite reductases, one coupled with copper (encoded by *nirK*) and the other coupled with cytochrome cd1 (encoded by *nirS*). The transformation of NO into N₂O (dinitrogen monoxide) involves NO reductase, which is a transmembrane enzyme encoded by the *norB* gene (Wallenstein et al., 2006). Finally, N₂O reductase, which transforms N₂O into dinitrogen (N₂), is a periplasmic enzyme encoded by the *nosZ* gene (Khalil, 2003). However, this last step leading to the emission of N₂, which can be fixed by some plants, is not present in all denitrifiers (Galloway et al., 2004). In European agroecosystems, losses due to N₂O emissions account for 59% of the N loss of the system (Oenema et al., 2009).

Recently, Bardon et al. (2014) demonstrated that the invasive species *Fallopia* spp. can inhibit denitrification activity in soils through the release of procyanidins, a phenomenon termed biological denitrification inhibition (BDI). Procyanidins specifically inhibit membrane-bound NO₃ reductase, inducing enzymatic conformational changes through membrane disturbance (Bardon et al., 2016). This strategy leads to a reduction in N₂O emissions from soil of up to 95% (Bardon et al., 2014). In addition, it has been shown that the addition of procyanidins to the soil under experimental conditions in mesocosms leads to a 6-fold increase in the amount of nitrate compared to untreated soil, which reduces denitrification activity without affecting either the respiration or mineralization activities of soil microbial communities (Bardon et al., 2016). This strategy could make nitrate more available in the soil, which may then be used by plants for their growth.

So far, the extent to which procyanidins can affect plant growth and nutrition via BDI under field conditions has not been investigated. Our hypothesis is that the addition of procyanidins to cultivated soils under field conditions induces BDI, with an increase in available nitrate and therefore a gain in productivity. To test our hypothesis, field experiments were carried out on cos or romaine lettuce crops (*Lactuca sativa*) at the SERAIL experimental station (Brindas, 69126 Rhône, France). Different concentrations of procyanidins were tested in the lettuce fields: 0, 8, 42, 83 and 210 kg ha⁻¹. Soil denitrification enzyme activity (DEA), nitrate concentration, above- and below-ground lettuce traits (shoot and root fresh masses, specific leaf area, biomechanical traits of leaves, anthocyanin and flavonoid contents of leaves and N content of tissues) and the abundance of all bacteria and denitrifiers were measured in lettuces treated or untreated with procyanidins.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth and experimental design

A 202 m² field (composed of 24 plots of 1.4 m × 6 m (8.4 m²)) located at the SERAIL experimental station (Brindas, 69126 Rhône, France) (45°43'46.4"N 4°43'37.1"E) was used for growing romaine lettuces (*Lactuca sativa* var Lotus RZ), following a Fisher system of 4 plots per treatment (Preece, 1990). Lettuce seedlings were planted in three rows spaced 0.45 m apart and each lettuce spaced 0.45 m apart, for a total of 39 lettuces per plot (156 lettuces per treatment). Six treatments were considered: unplanted soil, soil with lettuce without procyanidin addition, and 4 lettuce crops treated with procyanidins at 8, 42, 83 and 210 kg ha⁻¹. These concentrations are based on those used in our previous studies *in vitro* (Bardon et al., 2014, 2016). Firstly, we considered the dry weight of soil in the field at 10 cm of depth corresponding to lettuce seedling roots implantation. Secondly, we measured a surface relative to this weight, and then, we estimated the weight of 10 cm of soil per hectare. Finally, we calculated how much kg ha⁻¹ of procyanidins must be added to the plots to obtain the equivalent of 0.01, 0.05, 0.1 and 0.25 mg of procyanidins per gram of soil.

The entire experiment was watered the first week after planting with 3 mm of water every day. For the next 10 days, 8 mm of watering was done per day. From then until the end of the experiment, 12 mm of

watering was done every two days. Procyanidins were added 2 weeks after planting (stage 7–9 leaves) on a soil whose nitrate had been brought up to the ZENIT grid standard, i.e. 45 kg-NO₃⁻ ha⁻¹ (Despujols, 1997). The commercial procyanidins (Laffort TANIN VR GRAPE[®], Bordeaux, France) were applied in aqueous solution (standard water) by 2 nozzle spray booms, such as to give 500 L/ha or 0.42 L per plot, between the rows of lettuce, and the soil was then hoed. The site was watered (with 8 mm) just after the addition of procyanidins.

2.2. Measurement of lettuce traits

2.2.1. Measurement of lettuce mass, specific leaf area (SLA) and flavonoid levels in leaves

After 6 weeks of growing, the lettuces were harvested and 12 shoots only per plot were used to determine the fresh weight of the aerial parts. In addition, 4 whole lettuces per plot were used to determine their mass and to recover the root system and the three leaves of the fourth crown for further analysis.

Each fresh lettuce was weighed on a balance (± 0.5 g). The root system was washed with distilled water and weighed with a precision balance (± 0.001 g), dried at 68 °C for 24 h and weighed again on the same balance in order to determine dry mass.

The three leaves from the 4th leaf crown were scanned using Winfolia software (Regent Instruments Inc., Canada), weighed on a precision balance (± 0.001 g), and then used for biomechanical measurements (see point 2.2). The cut-out parts for biomechanical measurements were put back with the initial weighed material and finally dried at 68 °C for 24 h and weighed again. The SLA was calculated by dividing the surface area by the dry mass (cm² g⁻¹). Each week, measurements of flavonoid and anthocyanin levels were made on the 4th leaf of 4 lettuces per plot using Dualex[™] (FORCE-A, Orsay, France) technology.

2.2.2. Leaf mechanical properties

One piece of tissue was cut from each leaf (on 4 leaves per plot), for biomechanical measurements. Leaf toughness was measured using 'punch and die' tests, which consist in punching a hole through the leaf lamina. Tests were performed on a universal testing machine (Instron 5942, Canton, MA, USA) using a device consisting of a flat-ended cylindrical steel rod (punch, 2.0 mm diameter) mounted onto the moving head of the testing machine, and a stationary base with a sharp edged hole with a 0.1 mm clearance according to Foucreau et al. (2013). The punch moved down at a constant speed of 10 mm s⁻¹, without any friction in the hole. The leaves were positioned to avoid primary and secondary veins. The force applied to the leaf and the displacement were both recorded simultaneously at 10 Hz. Leaf thickness (± 0.01 mm) was measured with a digital thickness gauge avoiding major veins. The specific work to punch (called specific toughness, J m⁻³) was calculated as the area under the force-displacement curve corrected by the area of the punch and the leaf thickness (Aranwela et al., 1999).

2.3. Plant N content

Total N concentration was measured from 4 leaves and 4 root systems per plot (16 per treatment), using 1.5 mg of ground root or leaf material enclosed in tin capsules, using a Flash 1112 Elemental Analyzer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Calibration was performed using aspartic acid (10.52% N) and birch leaf standards (2.12% N; Elemental Microanalysis, Okehampton, UK) interspersed with the samples and used as quality control. Leaf and/or root N content represent the percentage of N in leaf and/or root dry mass.

2.4. Denitrification enzyme activity (DEA)

Denitrification enzyme activity (DEA) was measured from pooled

root-adhering soil (RAS) retrieved from 4 lettuces per plot and from 4 samples of bulk soil, according to Guyonnet et al. (2017). First, 5 g of soil was placed in 150 ml airtight plasma-flasks sealed with rubber stoppers. In each flask, air was removed and replaced with a He/C₂H₂ mixture (90: 10, v/v) to create anoxic conditions and inhibit N₂O-reductase. A nutritive solution (1 ml) containing glucose (0.5 mg of C-glucose g⁻¹ of dried soil), glutamic acid (0.5 mg of C-glutamic acid g⁻¹ of dried soil) and potassium nitrate (50 mg of N-KNO₃ g⁻¹ of dried soil) was added to the soil. N₂O levels during incubation at 28 °C were measured each hour for 6 h. The slope of the linear regression (R² on average greater than 0.98) was used to estimate DEA as the N₂O produced (g⁻¹h⁻¹). Gases (CO₂ and N₂O) were measured with a gas chromatograph coupled to a micro-catharometer detector (μGC-R3000; SRA instruments).

2.5. Nitrate concentrations in soil

NO₃⁻ was extracted every week over time (6 extractions per week) from the planted rhizospheric soils (20 cm from the base of 4 lettuces per plot and pooled) and from the unplanted soils. Nitrate was extracted from 5 g eq. of dried soil supplemented with 20 ml of a solution with 0.01 M of CaCl₂ (Houba et al., 2000). Briefly, soil suspensions were shaken at 140 rpm for 2 h at 10 °C. The suspension was filtered (0.22 μm) and the NO₃⁻ concentration was quantified using an ionic chromatograph ICS-900 (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, California, USA).

2.6. Effect of procyanidins on the NarG of nitrate reducing bacteria

To determine whether procyanidins act specifically on the nitrate reductase (NarG) enzyme of denitrifiers, we used two nitrate reducers (but not denitrifier) strains: *Escherichia coli* MG1655 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, and a denitrifying strain: *Pseudomonas brassicacearum* NFM421. The three strains were grown in 20 ml of Lysogeny Broth (LB) medium supplemented with KNO₃ (20 mM) and procyanidin at 0.01 mg ml⁻¹, or water as a control. The experiments were performed in plasma flasks sealed with a rubber stopper. To ensure anaerobic conditions, the air was removed as in denitrification measurements. Plasma flasks were inoculated with each strain independently in triplicate at Optical Density (OD) 0.1 and incubated at 28 °C for *P. brassicacearum*, 37 °C for *E. coli* and 30 °C for *C. glutamicum*, with agitation (140 r.p.m.). Growth (OD measurement) and counts on Petri dishes (LB medium) were done from 1 ml of recovered medium at t0, 2, 4, 25 and 30 h of growth. The count was made using an automatic counter (Scan 1200, Grosseron, Coueron, France) from the 1 ml of medium recovered each time, and diluted by a factor of 10⁴. Cultured petri dishes were incubated at the same temperature as previously stated for each strain.

2.7. Quantification of total bacteria and denitrifier abundance

Total DNA was extracted from 0.5 g of RAS for three treatments (unplanted soil, soil with lettuce, soil with lettuce given 210 kg of procyanidins per hectare), in triplicate using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP), according to the manufacturer's protocol. The amount of DNA extracted was estimated using a Quant-iT PicoGreen[®] dsDNA Assay kit. The amounts of bacteria and denitrifiers were quantified using real-time quantitative PCR (q-PCR) with primers targeting the 16S rRNA and *nirK/nirS* genes, as described previously by Bru et al. (2011). For *nirK*, the amplification was performed using the primers *nirK876* (5'-ATYGGCGGVCAYGGCGA-3') and *nirK1040* (5'-GCCTCGA-TCAGRTTGTGGT-3') (Henry et al., 2004). The 20 μl final reaction volume contained SYBRgreen PCR Master Mix (QuantiTect SYBRgreen PCR kit, Qiagen, Courtaboeuf, France), 1 μM of each primer, 400 ng of T4gp32 (MPbiomedicals, Illkovich, France) and 5 ng of extracted DNA. Thermal cycling was as follows: 15 min at 95 °C; 6 cycles at 95 °C for

15s, 63 °C for 30s, with a touchdown of -1 °C by cycle, 72 °C for 30s; 40 cycles at 95 °C for 15s, 58 °C for 30s and 72 °C for 30s. For *nirS*, the amplification was performed using the primers *nirScd3aF* (5'-AACGY-SAAGGARACSGG-3') and *nirSR3cd* (5'-GASTTCGGRTGSGTCTTSAY-GAA-3') (Throbäck et al., 2004). The 25 μl final reaction volume contained SYBR green PCR Master Mix (as above), 1 μM of each primer, 400 ng of T4gp32 (MPbiomedicals, Illkovich, France) and 12.5 ng of extracted DNA. Thermal cycling was as follows: 15 min at 95 °C; 6 cycles at 95 °C for 15s, 59 °C for 30s with a touchdown of -1 °C by cycle, 72 °C for 30s and 80 °C for 30s; 40 cycles at 95 °C for 15s, 54 °C for 30s, 72 °C for 30s and 80 °C for 30s). For 16S rRNA, the amplification was performed using the primers 519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAAWC-3') and 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') (Lane, 1991). The 20 μl final reaction volume contained Mix SYBR[®] Green Master (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), 1 μM of each primer and 5 ng of extracted DNA. Thermal cycling was as follows: 10 min at 95 °C; 40 cycles at 95 °C for 15s, 63 °C for 30s and 72 °C for 30s; Then 95 °C for 1 s; 65 °C for 60 s, 68 °C for 20s and a continuous increase to 97 °C to determine the melting point and finally 10 s at 40 °C for cooling. The standard curves for *nirK* and *nirS* qPCR were generated by amplifying 10-fold dilutions (10⁷-10²) of a linearized plasmid containing the *nirK* gene of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *nirS* gene of *Pseudomonas stutzeri* Zobell DNA (GenArt, Invitrogen, Lifetechnologies, Regensburg, Germany). The standard curves for 16S rRNA qPCR were generated by amplifying 10-fold dilutions (10⁸-10²) of the standard DNA pQuantAlb16S plasmid (Zouache et al., 2012) for 16S rRNA. Melting curve analysis confirmed the specificity of amplification and amplification efficiencies for 16S rRNA, *nirK* and *nirS* genes were higher than 90%.

2.8. Root development of lettuce seedlings on Knop agar

Lettuce seeds (*Lactuca sativa* var Lotus RZ) were disinfected according to Bressan et al. (2009), then cultured on Petri dishes (12 × 12 cm) with 100 ml of Knop agar (4 mM Ca(NO₃)₂; 1.8 mM KH₂PO₄; 3.4 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 1 μM ZnSO₄; 14 μM MnCl₂; 70 μM H₃BO₃; 10 mM CoCl₂; 0.5 μM CuSO₄; 0.2 μM Na₂MoO₄; 50 μM FeNa-EDTA; Agar concentration: 0.8%) (Hornschuh et al., 2002). Commercial procyanidins (Laffort, Bordeaux, France) were added with a 0.2 μm filter after Knop agar autoclaving. Three conditions were tested, one control condition without the addition of procyanidins and two conditions with 0.1 and 0.2 mg of procyanidins per ml of Knop agar, based on Bardon et al. (2016). For each condition, three Petri dishes containing 9 seeds (3 replicates and 27 pseudoreplicates) were used. Each Petri dish was grown in phytotron (SANYO, Osaka, Japan) at 22 °C, with the day/night period set at 16 h/8 h. After 14 days of growth, the fresh mass of all roots was measured with a precision balance ± 0.0001 g. Root development (root length and root surface) was analysed using WinRhizo software (Regent Instruments Inc., Canada), then placed in an oven at 68 °C for 24 h to obtain the dry mass.

2.9. Data and statistical analyses

The differences on microbiological and lettuce morphological traits (n ≤ 4) between treatments was tested non-parametrically with a Wilcoxon test. Linear regression was performed to test the functional relationship between the procyanidin concentrations and the response variables. The significance of this regression was tested by Bravais-Pearson test. The difference of lettuce morphological traits (n ≥ 16) between treatments was determined using an ANOVA (analysis of variance) followed by a post-hoc Tukey HSD test. Similarly, the normality (Shapiro test) and the homoscedasticity of variance (Fischer test) of all the variables were tested. For nitrate concentrations data, we compared the concentrations between treatments for each date. In addition, the absence of plot effect was tested on all traits using two-way ANOVA and mixed model. The effect of procyanidins on lettuce seeds was tested using an two-way ANOVA. All the analyses were done using

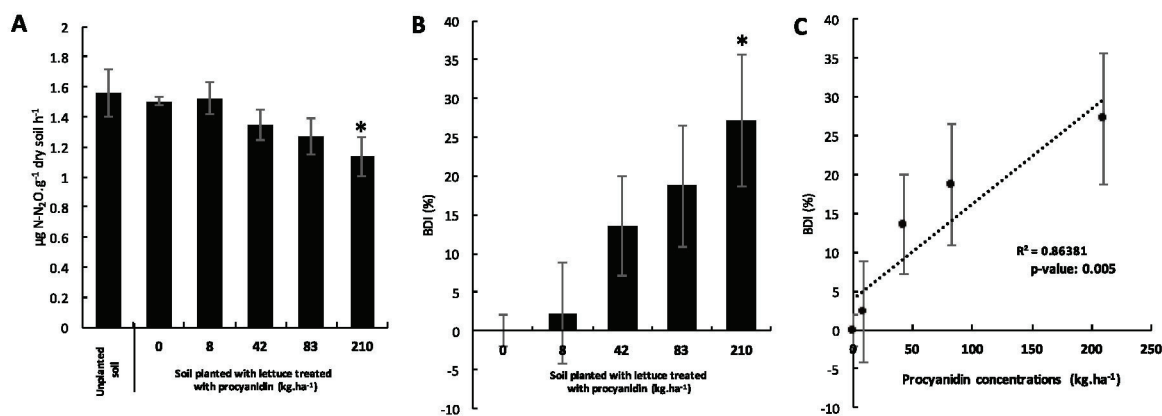


Fig. 1. Impact of procyanidins applied in the field on microbial denitrification activity. Effects of different concentrations of procyanidins (0, 8, 42, 83 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on the denitrification activity of microbial communities colonising the root-adhering soil of treated lettuces. $n = 4$ for each treatment. (A) Denitrification Enzyme Activity (DEA, $\mu\text{g N-N}_2\text{O h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dry soil h^{-1}) among treatments. (B) Biological Denitrification Inhibition (BDI %). (C) Linear regression of the functional relationship between the procyanidin concentrations (kg.h^{-1}) and BDI (%). Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed from the relative controls (Wilcoxon test; $\alpha < 0.05$).

R project software (v. 3.5.0).

3. Results

3.1. Denitrification activity and biological denitrification inhibition

The denitrification activity of microbial communities colonizing the RAS of lettuces treated with 210 kg ha^{-1} of procyanidins was significantly lower ($p\text{-value} = 0.023$) than that of microbial communities of untreated lettuces. No significant differences in denitrification activity were observed between the RAS from treated lettuces with 8, 42 or 83 kg ha^{-1} of procyanidins and that from untreated lettuces (Fig. 1A). In addition, the BDI at 210 kg ha^{-1} was not significantly different from that at other concentrations. The decrease in denitrification activity at 210 kg ha^{-1} of procyanidins represents a BDI of approximately 27.17% ($p\text{-value} = 0.023$) (Fig. 1B). In addition, untreated lettuce did not induce BDI compared to unplanted soil as they both presented the same level of denitrification activity. Moreover, the CO_2 emissions under these conditions did not differ between treatments (data not shown). Interestingly, the biological denitrification inhibition showed a significant dose-response relationship to procyanidins (Fig. 1C).

3.2. Effect of procyanidins on *NarG* of nitrate-reducing bacteria

As shown in Fig. 2, the addition of procyanidins, at 0.01 mg ml^{-1} , to *E. coli* and *C. glutamicum* cultures did not affect their growth compared to untreated cultures. However, *P. brassicacearum* growth was significantly lower ($p\text{-value} = 0.044$ for OD, $p\text{-value} = 0.037$ for enumeration) after the addition of procyanidins.

3.3. Abundance of total and denitrifying bacteria

The abundance of denitrifying bacteria was represented by the sum of the copy numbers of the *nirS* and *nirK* genes (Fig. 3). The results obtained showed significant differences ($p\text{-value} = 0.045$) among the three treatments (Fig. 3A). The total proportion of denitrifiers from the RAS of lettuces treated with 210 kg ha^{-1} of procyanidins was 4.5 times lower than that from the RAS of untreated lettuces. However, the total abundance of bacteria, represented by the copy number of 16S rRNA genes per gram of dry soil, did not show any significant variation among the different treatments (Fig. 3B). The proportion of denitrifying bacteria (Fig. 3C), represented by the ratio (*nirK* + *nirS*)/ARNr16S, in the RAS of lettuces treated with procyanidins was 5-fold lower ($p\text{-value} = 0.046$) than that in the RAS of untreated lettuces.

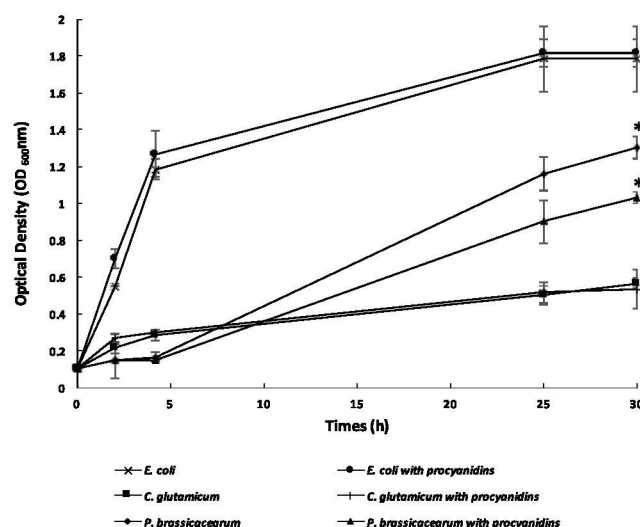


Fig. 2. Effects of procyanidins (0.01 mg ml^{-1}) on *E. coli* MG1655, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and *Pseudomonas brassicacearum* NFM421 anaerobic growth. Optical density was measured over time (0, 2, 4, 25 and 30 h). Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed from the relative controls (Wilcoxon test; $\alpha < 0.05$).

3.4. Effect of soil procyanidin addition to soil on nitrate concentrations

In the plant treatments with or without the addition of procyanidins, nitrate levels tended to decrease over time (Fig. 4). This decrease was greater in the planted soils than in the unplanted soils. The planted soils contained less nitrate than the unplanted soils ($p\text{-value} = 0.034$). In addition, there was no difference in nitrate concentration each week between treatments amended with procyanidins (Fig. 4).

3.5. Effect of procyanidin addition on lettuce traits

The fresh mass of the shoot and root parts of lettuces tended to increase with the addition of $0\text{--}210 \text{ kg ha}^{-1}$ procyanidins (Fig. 5 A and B). Indeed, the fresh mass of the shoot and root parts showed a significant dose-response relationship to procyanidins ($p\text{-value} = 0.003$ for the shoot mass and 0.0016 for the root mass) (Fig. 5C and D). The shoot fresh mass of the lettuces treated with 210 kg ha^{-1} procyanidins was significantly (16%) higher per lettuce (on average 120 g) ($p\text{-value} = 0.021$) than that of untreated lettuces (Fig. 5A). Similarly, the root fresh mass of lettuces treated with procyanidins at 83 kg ha^{-1} and

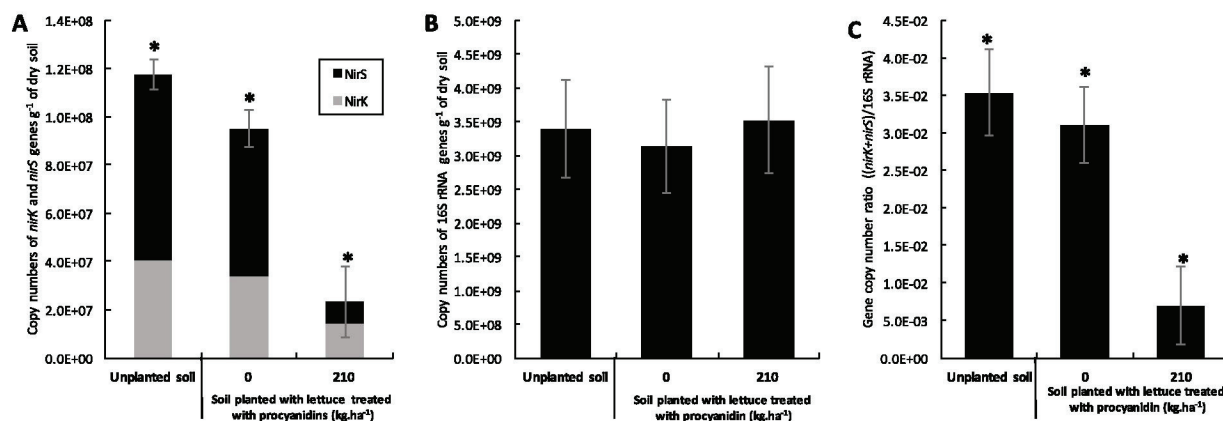


Fig. 3. Effects of procyanidins (210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on the abundance of (A) denitrifying bacteria (copy numbers of *nirK* (grey bar) and *nirS* genes (dark bar) g⁻¹ of dry soil), (B) whole bacterial community (copy numbers of 16S rRNA g⁻¹ of dry soil) and (C) gene abundance ratios of (*nirK* + *nirS*)/16S rRNA. n = 3 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed from the relative controls (Wilcoxon test; $\alpha < 0.05$).

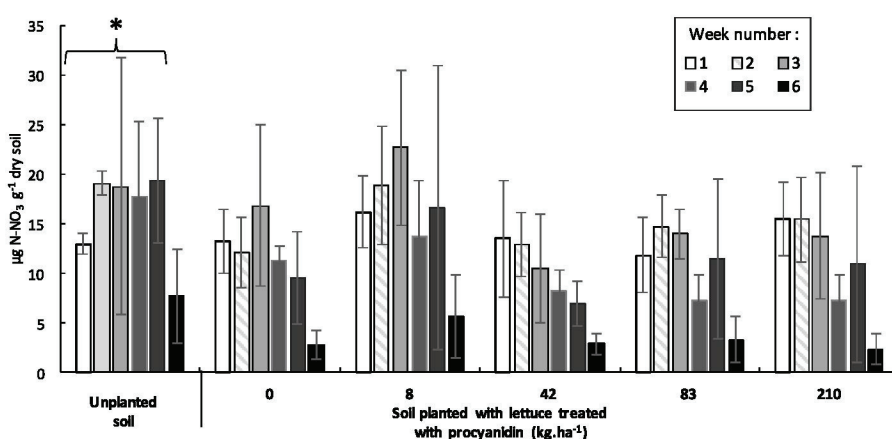


Fig. 4. Effect of procyanidins addition on soil nitrate level. Effects of different concentrations of procyanidins (0, 8, 42, 83 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on the nitrate concentration (µg N-NO₃ g⁻¹ dry soil) measured every week (weeks 1–6) from the root-adhering soil of lettuce. Procyanidins were applied to soil planted on week 2. N = 4 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed from the relative controls (Wilcoxon test; $\alpha < 0.05$).

210 kg ha⁻¹ was 39% (p-value = 0.023) and 63% (p-value = 0.002) higher per lettuce, respectively, than the root fresh mass of untreated lettuces (Fig. 5B). In addition, the root dry mass of lettuces treated with procyanidins at 83 kg ha⁻¹ and 210 kg ha⁻¹ was significantly greater by 52% (p-value = 0.048) and 97% (p-value = 0.028) per lettuce, respectively, than the root dry mass of untreated lettuces. Moreover, the anthocyanin and flavonoid levels, as well as the SLA (cm² g⁻¹), did not differ between procyanidin-treated and untreated lettuces (Figs. S1 and S2), and the specific toughness (J m⁻³) did not differ among the three leaves of the 4th crown of treated and untreated lettuces (Fig. 6).

3.6. Nitrogen concentration in plants

Overall, the nitrogen content in the tissues (shoot and root) did not differ between treatments and was approximately 3% in shoots and 1.7% in roots (Fig. 7). However, by relating this percentage of nitrogen in the plant to the mass gain of treated lettuces, we obtain an average gain of 3.6 g of nitrogen per lettuce treated at a concentration of 210 kg ha⁻¹.

3.7. Effect of procyanidins on root development in vitro

To test whether the addition of procyanidins had a direct impact on root system development, we measured the length and surface area of fresh lettuce roots in Knop agar with or without added procyanidins (Fig. 8). The results showed no significant differences in the fresh mass of young lettuce roots grown in Knop agar with or without added procyanidins (Fig. 8A). The dry weight was slightly lower at

0.2 mg ml⁻¹ procyanidins than under other conditions (Fig. 8B); however, this decrease was not significant. Similarly, no significant differences were observed in the length (Fig. 8C) and root surface area (Fig. 8D) of plants grown with or without the addition of procyanidins.

4. Discussion

In this study, we found that the addition of 210 kg ha⁻¹ procyanidins to field-grown lettuce crops lead to a significant gain in productivity, resulting from BDI.

4.1. The addition of procyanidins under field conditions causes BDI and changes in denitrifier abundance

Denitrification is an inducible function that requires favourable conditions to be expressed: low oxygen concentration, easily available organic compounds as energy sources and the presence of nitrate. In plant rhizospheres, the roots of growing plants cannot only release carbon compounds via exudation but also modify the soil oxygen partial pressure and the nitrate concentration (Lecomte et al., 2018; Achouak et al., 2019). In our case, the addition of procyanidins led, as expected, to a significant decrease in the denitrification activity of lettuce RAS treated with procyanidins at 210 kg ha⁻¹, which corresponded to a BDI of approximately 27.17% (Fig. 1B). Although denitrification enzyme activity did not decrease under 8, 42 and 83 kg ha⁻¹ of procyanidin amendment (Fig. 1A), the biological denitrification inhibition showed a significant dose-response relationship to procyanidins ($R^2 = 0.863$, p-value = 0.005) (Fig. 1C), which was consistent with the result of a

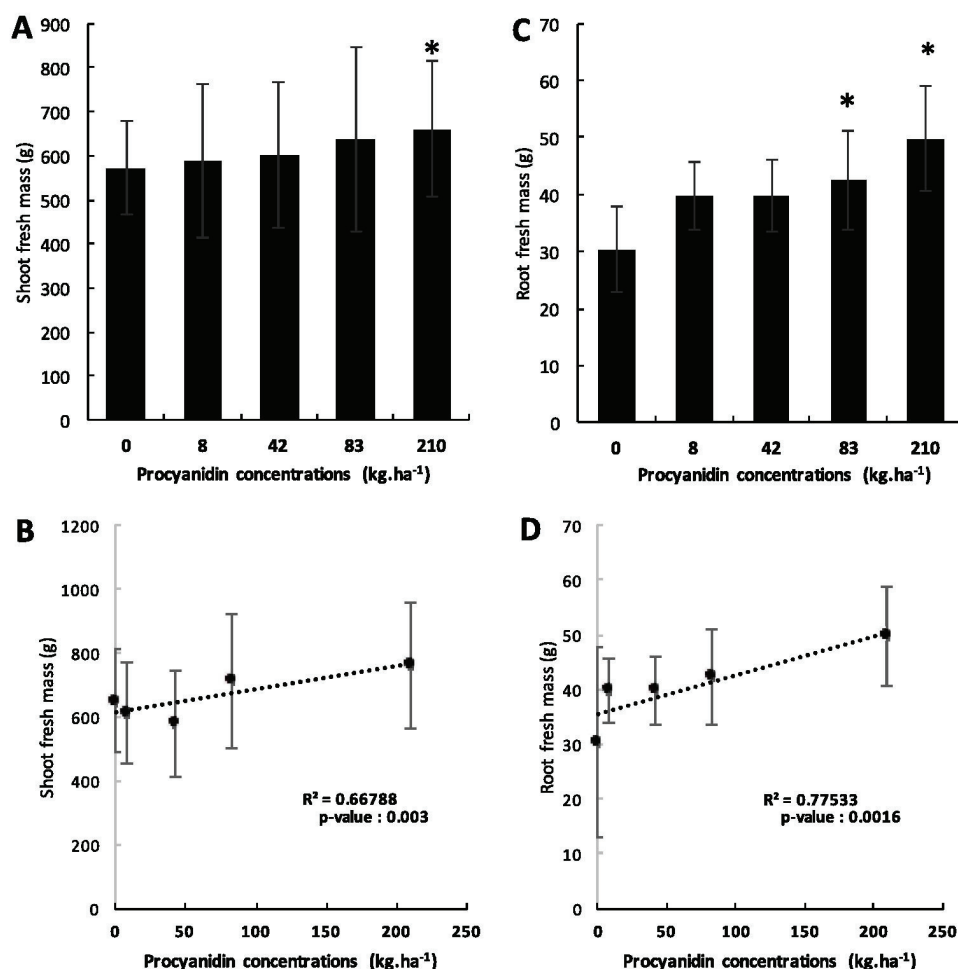


Fig. 5. Effects of different concentrations of procyanidins (0, 8, 42, 83 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on the fresh mass of (A) shoots (g) and (B) roots (g). Linear regression of the functional relationship between procyanidins concentrations and shoot (C) and root (D) fresh mass (g). $n = 16$ for root system and $n = 64$ for shoots, for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Stars indicate which means differed from the relative controls (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

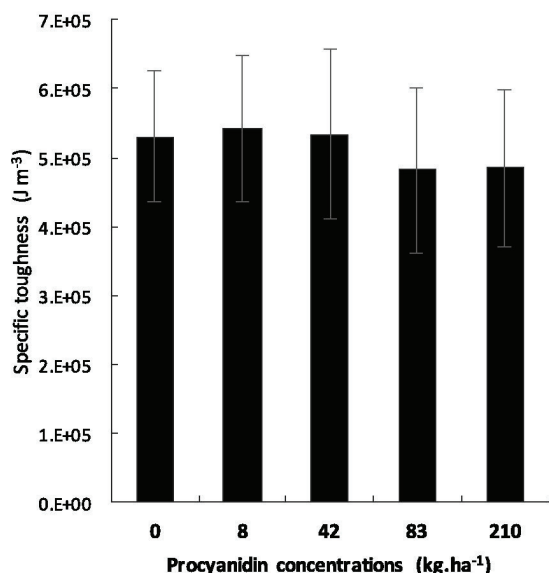


Fig. 6. Effects of different concentrations of procyanidins (0, 8, 42, 83 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on specific toughness (J m⁻³). $n = 16$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. No significant effect (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

previous study by Bardon et al. (2014). Indeed, the same concentrations tested *in vitro* on the *P. brassicacearum* strain induced a significant decrease in DEA (Bardon et al., 2014), which was observed in the field only at the largest concentration. This result could be explained by the fact that procyanidins at a low concentration may aggregate with soil particles and become less bioavailable. However, at 210 kg ha⁻¹, the highest procyanidin concentration, procyanidins were more bioavailable in the soil.

Although denitrification by archaea (Shoun et al., 1992) and fungi (Philippot, 2002) cannot be excluded, procyanidin amendment was demonstrated to have an impact on denitrifying bacteria, such as the *P. brassicacearum* NFM421 strain. Indeed, Bardon et al. (2016) demonstrated that procyanidins act specifically by inhibiting membrane-bound NO₃-reductase, thereby inducing enzymatic conformational changes through membrane disturbance. However, some bacteria are not denitrifiers but do possess this enzyme (NarG), such as *E. coli* (Taniguchi and Itagaki, 1960) and *C. glutamicum* (Nishimura et al., 2007). Our results showed that the nitrate reductase of these non-denitrifiers was not affected by procyanidins (Fig. 2). Procyanidins act specifically on the NarG of denitrifiers that contribute to N₂O emissions. However, as other nitrate reducers are part of the rhizospheric microbial community, the *narG* gene cannot be used as marker for denitrifiers. Thus, we chose to target the *nirK* and *nirS* genes as markers for denitrifiers to assess the impact of procyanidins on denitrifiers. At 210 kg ha⁻¹ of procyanidins, the proportion of denitrifying bacterial communities in the lettuce rhizosphere was reduced (Fig. 3A). The loss

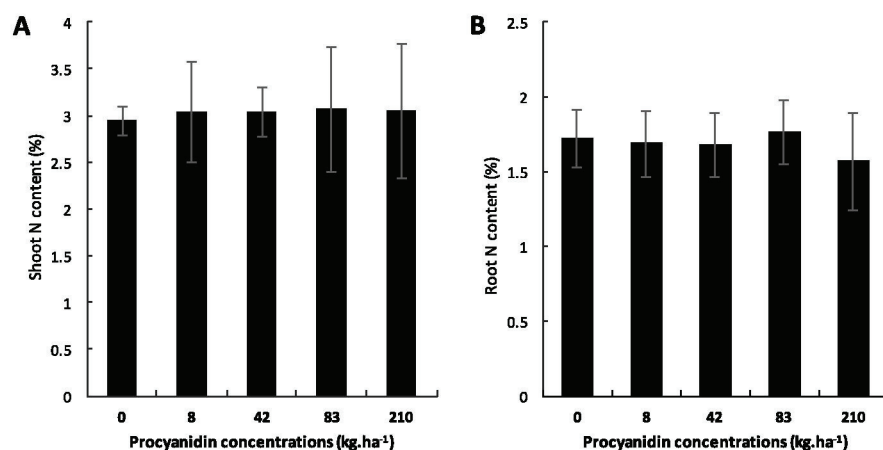


Fig. 7. Nitrogen concentration in plants treated with procyanidins. Effects of different concentrations of procyanidins (0, 8, 42, 83 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied in the field to the soil planted with lettuces on (A) leaf and (B) root N content (% of dry mass). $n = 4$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. No significant effect (Wilcoxon test; $\alpha < 0.05$).

of the denitrification function is probably a disadvantage for the denitrifying bacterial community, which becomes less competitive, thus explaining their counter-selection in the rhizosphere. Denitrifiers can no longer use nitrate as an electron acceptor, which reduces their multiplication and their inclusion in the rhizosphere ecological niche, as observed in Dassonville et al. (2011). The fact that the total bacterial community abundance (Fig. 3B) and CO₂ release from the microbial community colonizing the RAS of treated lettuces did not change in the presence of procyanidins suggests that (i) other bacterial communities colonized the niches left vacant by denitrifying bacteria, as demonstrated by Jones and Hallin (2010) and (ii) procyanidin addition did not have an antibacterial effect under field conditions, in contrast to the result of Mayer et al. (2008) and Lacombe et al. (2012), where

procyanidins had antibacterial properties against some bacterial species.

4.2. The addition of procyanidins in the field modifies the soil nitrate concentration and increases lettuce growth

In *in situ* microcosm experiments, Bardon et al. (2017) observed nitrate conservation in unplanted soil treated with procyanidins compared to untreated soil. Indeed, BDI, which is induced by procyanidins, allows up to 6 x greater storage of nitrate in the soil (Bardon et al., 2017). To limit nitrate leaching and make nitrate available for lettuce crops, we added procyanidins one week before the period when the lettuces needed the maximum amount of nitrate for growth (according

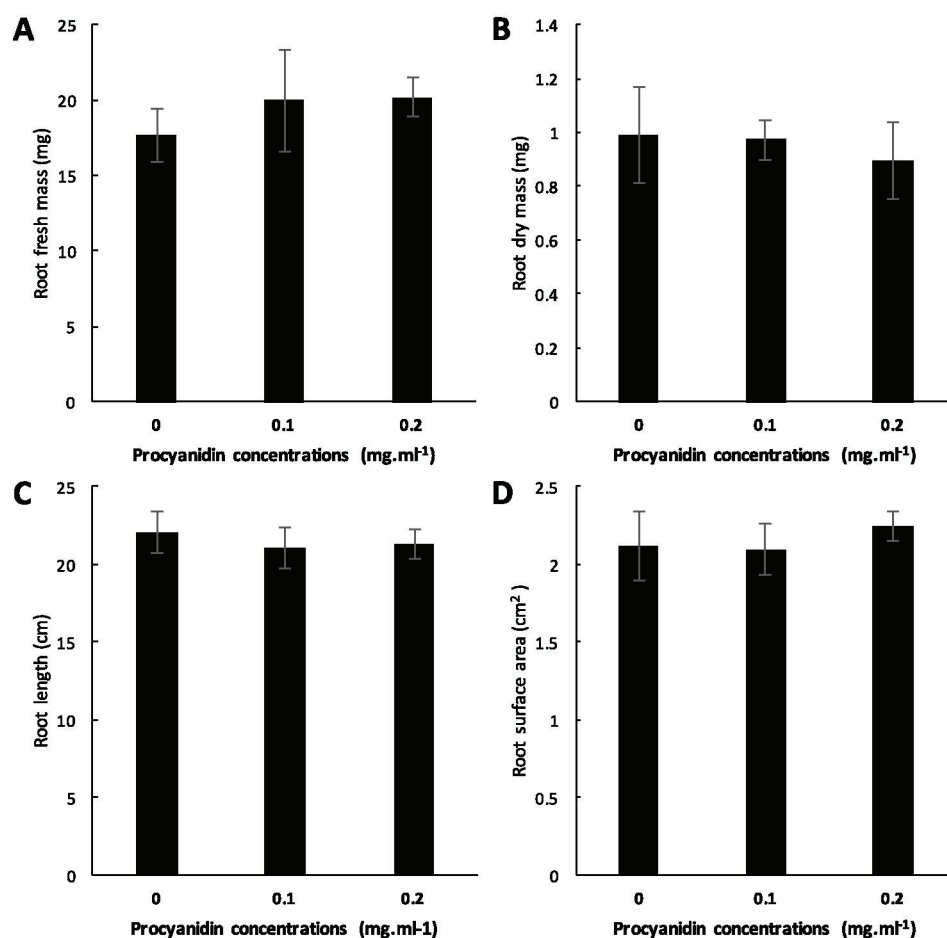


Fig. 8. Effect of procyanidins on root development *in vitro*. Effects of different concentrations of procyanidins (0; 0.1 and 0.2 mg procyanidins per ml agar) amended to lettuces seedling growing on Knop agar on: (A) Root fresh mass (mg), (B) Root dry mass (mg), (C) Root length (cm) and (D) Root surface area (cm²). $n = 3$ replicates for each treatment and each replicate is the average of 9 seedlings. Vertical bars indicate standard errors. No significant effect (two-way ANOVA; $\alpha < 0.05$).

to the ZENIT grid standard for lettuce). No differences were observed in soil nitrate levels between lettuces treated or untreated with procyanidins, regardless of the concentration (Fig. 4), most likely due to nitrate absorption by lettuce crops. The addition of procyanidins at all tested concentrations tended to induce better lettuce growth as significant dose-response relationship was observed between shoot and root mass and procyanidins concentrations (Fig. 5). This growth improvement was significant only at the highest concentration (210 kg ha^{-1}), with an increase in the shoot of up to 16% and of the root of up to 63% (Fig. 5). At this concentration, denitrifiers appear to be inhibited enough to have a visible effect not only on denitrification activity but also on mass gains. However, at the other concentrations, procyanidins are probably less bioavailable in soil, explaining why no denitrifier inhibition allowing a decrease in nitrate consumption by bacteria was observed. Furthermore, the nitrogen levels in the tissues did not differ between treated and untreated lettuces regardless of the concentration (Fig. 7), which means that there were no physiological changes in lettuces due to the addition of procyanidins that allowed greater nitrogen absorption by the lettuces. However, since lettuces tend to grow better in plots treated with procyanidins, the larger mass implies a greater nitrogen mass. For example, at 210 kg ha^{-1} procyanidins, we obtained up to 3.6 g of nitrogen on average. Indeed, the procyanidin treatment allowed nitrogen to be preserved in the form of nitrate via biological inhibition of denitrifying bacteria; hence, more nitrate became available for lettuces, allowing better growth. This finding is consistent with the greenhouse study performed on several lettuce varieties, where plant nitrogen use efficiency was not affected by the nitrate concentrations in the soil (Urlić et al., 2017). SLA trait did not differ between treated and untreated lettuces, regardless of the concentration (Fig. S1), suggesting that treated lettuces did not change their resource allocation to leaf structure (Evans and Poorter, 2001). Moreover, the increase in plant growth did not alter the leaf quality of the lettuce. Indeed, the levels of flavonoids and anthocyanins did not differ between treated and untreated lettuces (Fig. S2), which explains the absence of stress that would have caused an increase in these levels in treated lettuces, as observed for nitrate-deficient wine grape and broccoli plants (Cervic et al., 2008; Tremblay et al., 2008). In addition, procyanidin amendment did not change the quality of the leaves as no changes in the applied force to pierce a leaf volume were observed (Fig. 6). This result suggests that the procyanidin amendment did not alter leaf vulnerability to potential herbivores and pests (Clissold et al., 2009), and did not induce a gustatory difference for consumers in the chewing quality of lettuces potentially placed on the market (Lopez-Galvez et al., 1997; Rico et al., 2007).

Interestingly, we showed a larger gain in root mass (up to 63%) than in shoot mass (up to 16%) (Fig. 5). This root mass gain is clearly not due to the direct effect of procyanidins on root development but due to the BDI of denitrifiers and therefore to better availability of nitrate in the rhizosphere of lettuces treated with procyanidins. Indeed, the absence of differences between lettuce seedlings grown in sterile medium with and without procyanidins (Fig. 8) allows us to conclude that procyanidins are not a source of carbon and/or a phytohormone for root development. As the denitrifier distribution in soil is heterogeneous, nitrates available for plants due to denitrifier inhibition will present a heterogeneous spatial distribution in soil. To benefit from this nitrate, plants concentrate new and more root growth in the nitrate-containing zone, which could explain the gain in root mass, as already demonstrated for young lettuce plants submitted to a heterogeneous spatial distribution of nitrate in the root zone (Burns, 1991).

The procyanidin source used in this study was from the wine industry and is used to mature wines with a too-low tannin content (Harbertson et al., 2012). The cost of this source of procyanidin is too high to be economically viable for field applications. We used it in our study to demonstrate, for the first time, that biological denitrification inhibition can occur in the field and can induce plant growth improvement. In the context of sustainable agriculture with economic

issues, there are other sources of procyanidins that are less expensive and have a higher concentration of procyanidins, such as mimosa and quebracho bark and grape seeds (Thompson and Pizzi, 1995; Gabetta et al., 2000; Vivas et al., 2004; Venter et al., 2012). Future studies using these sources of procyanidins in the field and evaluating the benefits/costs of such applications are needed.

5. Conclusions

The addition of procyanidins in the field allows a decrease in denitrification activity, making nitrates available at ground level, which results in an increase in lettuce yields without changing their physiology. Based on the results of this study, we propose in the short-term the development of a more environmentally friendly method of sustainable agriculture by limiting fertilizer use and nitrogen losses in the soil while increasing plant growth and productivity.

Acknowledgements

This work was supported by Auvergne-Rhône-Alpes region (ARC 2016–2019) for thesis subvention. We acknowledge funding from the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0005, DIORE). Quantitative PCR were performed at the DTAMB platform (FR BioEnviS, University Lyon1). Field experiments were performed at Serail station. Microbial activities were measured at the AME platform (UMR 5557) and C and N content were measured at Isotope Ecology platform (UMR 5023). We thank Laurent Philippot and Delphine Moreau for scientific discussions. The authors gratefully thank the editor Dr Kamlesh Jangid and reviewer for improving our manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.009>.

References

- Achouak, W., Abrouk, D., Guyonnet, J., Barakat, M., Ortet, P., Simon, L., Lerondelle, C., Heulin, T., Haichar, F.Z., 2019. Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiology Ecology* 95 fuz021.
- Aranwala, N., Sanson, G., Read, J., 1999. Methods of assessing leaf-fracture properties. *New Phytologist* 144, 369–383.
- Bardon, C., Piola, F., Bellvert, F., Haichar, F.Z., Comte, G., Meiffren, G., Pommier, T., Puijalon, S., Tsafack, N., Poly, F., 2014. Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. *New Phytologist* 204, 620–630.
- Bardon, C., Poly, F., Haichar, F.Z., Le Roux, X., Simon, L., Meiffren, G., Comte, G., Rouifed, S., Piola, F., 2017. Biological denitrification inhibition (BDI) with procyanidins induces modification of root traits, growth and N status in *Fallopia x bohemica*. *Soil Biology and Biochemistry* 107, 41–49.
- Bardon, C., Poly, F., Piola, F., Pancton, M., Comte, G., Meiffren, G., Haichar, F.Z., 2016. Mechanism of biological denitrification inhibition: procyanidins induce an allosteric transition of the membrane-bound nitrate reductase through membrane alteration. *FEMS Microbiology Ecology* 92.
- Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F.Z., Achouak, W., Berge, O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *The ISME Journal* 3, 1243.
- Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P.A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arrouays, D., Philippot, L., 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *The ISME Journal* 5, 532.
- Burns, I.G., 1991. Short-and long-term effects of a change in the spatial distribution of nitrate in the root zone on N uptake, growth and root development of young lettuce plants. *Plant, Cell and Environment* 14, 21–33.
- Cervic, Z.G., Moise, N., Agati, G., Latouche, G., Ghazlen, N.B., Meyer, S., 2008. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 650–654.
- Chapman, S.K., Langley, J.A., Hart, S.C., Koch, G.W., 2006. Plants actively control nitrogen cycling: uncorking the microbial bottleneck. *New Phytologist* 169, 27–34.
- Clissold, F.J., Sanson, G.D., Read, J., Simpson, S.J., 2009. Gross vs. net income: how plant toughness affects performance of an insect herbivore. *Ecology* 90, 3393–3405.
- Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P., Poly, F., 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* 13, 1115–1133.
- Despujols, J., 1997. Control of Nitrate Level in Autumn Greenhouse Lettuce. *Infos CTIFL*,

- France.
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 64, 237–256.
- Evans, J., Poorter, H., 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment* 24, 755–767.
- Foucreau, N., Puijalon, S., Hervant, F., Piscart, C., 2013. Effect of leaf litter characteristics on leaf conditioning and on consumption by *G. ammarius pulex*. *Freshwater Biology* 58, 1672–1681.
- Gabetta, B., Fuzzati, N., Griffini, A., Lolla, E., Pace, R., Ruffilli, T., Peterlongo, F., 2000. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* 71, 162–175.
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226.
- Guyonnet, J.P., Vautrin, F., Meiffren, G., Labois, C., Cantarel, A.A., Michalet, S., Comte, G., Haichar, F.Z., 2017. The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites. *FEMS Microbiology Ecology* 93.
- Harbertson, J.F., Parpinello, G.P., Heymann, H., Downey, M.O., 2012. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry* 131, 999–1008.
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J.C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., Philippot, L., 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 59, 327–335.
- Hornschuh, M., Grotha, R., Kutschera, U., 2002. Epiphytic bacteria associated with the bryophyte *Funaria hygrometrica*: effects of *Methylobacterium* strains on protonema development. *Plant Biology* 4, 682–687.
- Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., Van Vark, W., 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31, 1299–1396.
- Jones, C.M., Hallin, S., 2010. Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *The ISME Journal* 4, 633.
- Khalil, K., 2003. Emissions de N₂O par nitrification et dénitrification à l'échelle de la motte de sol: effet de la structure du sol, de l'aération et des activités microbiennes. PhD Thesis. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Knops, J.M.H., Bradley, K.L., Wedin, D.A., 2002. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. *Ecology Letters* 5, 454–466.
- Kuzakov, Y., Xu, X., 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* 198, 656–669.
- Lacombe, A., Wu, V.C., White, J., Tadepalli, S., Andre, E.E., 2012. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology* 30, 124–131.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* 115–175.
- LeBauer, D.S., Treseder, K.K., 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89, 371–379.
- Lecomte, S., Achouak, W., Abrouk, D., Heulin, T., Nesme, X., Haichar, F.Z., 2018. Diversifying anaerobic respiration strategies to compete in the rhizosphere. *Frontiers in Environmental Science* 6, 139.
- Lopez-Galvez, G., Peiser, G., Nie, X., Cantwell, M., 1997. Quality changes in packaged salad products during storage. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 205, 64–72.
- Mayer, R., Stecher, G., Wuerzner, R., Silva, R.C., Sultana, T., Trojer, L., Feuerstein, I., Krieg, C., Abel, G., Popp, M., 2008. Proanthocyanidins: target compounds as antibacterial agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6959–6966.
- Nishimura, T., Vertès, A.A., Shinoda, Y., Inui, M., Yukawa, H., 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 889–897.
- Oenema, O., Witzke, H.P., Klimont, Z., Lesschen, J.P., Velthof, G.L., 2009. Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 133, 280–288.
- Philippot, L., 2002. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1577, 355–376.
- Preece, D.A., 1990. RA Fisher and experimental design: a review. *Biometrics* 925–935.
- Radersma, S., Smit, A.L., 2011. Assessing denitrification and N leaching in a field with organic amendments. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 58, 21–29.
- Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C., 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 373–386.
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J., 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* 94, 277–281.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Hurtado, M., del, P., Ono, H., Moreta, D.E., Salcedo, A.F., Yoshihashi, A.T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences Pnas-0903694106*.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y., Zakir, H., Deshpande, S.P., Hash, C.T., 2013. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil* 366, 243–259.
- Taniguchi, S., Itagaki, E., 1960. Nitrate reductase of nitrate respiration type from *E. COLI*: I. Solubilization and purification from the particulate system with molecular characterization as a metalloprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 44, 263–279.
- Thompson, D., Pizzi, A., 1995. Simple ¹³C-NMR methods for quantitative determinations of polyflavonoid tannin characteristics. *Journal of Applied Polymer Science* 55, 107–112.
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A.A., Hallin, S., 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 401–417.
- Tremblay, N., Belec, C., Jenni, S., Fortier, E., Mellgren, R., 2008. The Dualux—a new tool to determine nitrogen sufficiency in broccoli. In: *International Symposium on Application of Precision Agriculture for Fruits and Vegetables* 824, pp. 121–132.
- Urlić, B., Jukić Špika, M., Becker, C., Kläring, H.-P., Krumbein, A., Goretta Ban, S., Schwarz, D., 2017. Effect of NO₃ and NH₄ concentrations in nutrient solution on yield and nitrate concentration in seasonally grown leaf lettuce. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B Soil and Plant Science* 67, 748–757.
- Van der Salm, C., Dolfing, J., Heinen, M., Velthof, G.L., 2007. Estimation of nitrogen losses via denitrification from a heavy clay soil under grass. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119, 311–319.
- Venter, P.B., Sisa, M., van der Merwe, M.J., Bonnet, S.L., van der Westhuizen, J.H., 2012. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 1: the chemical composition of quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. *Phytochemistry* 73, 95–105.
- Vivas, N., Nonier, M.-F., de Gaulejac, N.V., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M., 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513, 247–256.
- Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M., Voytek, M., 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16, 2143–2152.
- Zouache, K., Michelland, R.J., Failloux, A.-B., Grundmann, G.L., Mavingui, P., 2012. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology* 21, 2297–2309.

CHAPITRE 3.

**Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) en
champs : effet sur la croissance de la laitue dans deux
types de sols différents**



Figure 23 : Photographies des parcelles de la deuxième expérimentation sur des cultures de laitues de gauche à droite : Manziat, Montluel et à la station expérimentale La Serail. Expérimentation où différentes concentrations de procyanidines ont été appliquées sur des cultures de laitues poussant sur différents sols : sableux (Manziat), limoneux (Montluel) et équilibré (La Serail).

Le premier essai discuté dans le précédent chapitre nous a permis de démontrer que l'ajout de procyanidines sur une culture de laitue induit un BDI et de ce fait, une conservation du nitrate dans le sol qui a permis une augmentation des traits de croissance de la culture et donc de la productivité végétale. Cet essai a été réalisé sur le sol équilibré (c'est-à-dire avec une proportion équilibrée des trois textures argile/sable/limon) de la station expérimentale de la Serail.

Les sols agricoles de la région Rhône-Alpes ont une diversité importante (Jamagne, 2011), et sont différents par leurs structures (Rabot et al., 2018). Dans ce troisième chapitre, nous avons voulu étudier **l'hypothèse que la stratégie végétale du BDI en champs pouvait s'appliquer sur différentes textures de sols**. Pour ce faire, avec l'aide de la station expérimentale de la Serail, nous sommes rentrés en contact avec des exploitations maraîchères de la région afin de pouvoir expérimenter plusieurs textures de sols.

Ainsi, nous avons testé l'effet des procyanidines sur des cultures de laitue d'une autre variété que dans le précédent chapitre (*Lactuca sativa* L.) poussant sur trois textures de sols différents : (1) à la Serail (Brindas 69126 Rhône, France) avec un sol à texture équilibrée, (2) dans un champ agricole à Manziat (01570 Ain, France) avec un sol à texture sableuse et (3) dans un champ agricole à Montluel (01120 Ain, France) avec un sol à texture limoneuse. Nous avons de même voulu savoir si l'ajout de procyanidines induisait un changement dans la structure du sol et par conséquent sur l'habitat des dénitrifiants.

Nous avons donc suivi les trois cultures de laitues en parallèle et appliqué les procyanidines de la même manière que pour la première expérimentation (chapitre 2), mais avec seulement les deux concentrations les plus fortes et qui avaient montré les meilleurs résultats, à savoir 87 et 210 kg.ha⁻¹. Sur l'ensemble de ces champs, nous avons mesuré l'activité de dénitrification potentielle (DEA, chromatographie gazeuse), la concentration en nitrate dans le sol (chromatographie ionique), l'abondance des communautés bactériennes totales et dénitrifiantes (qPCR sur l'ARNr 16S, *nirK* et *nirS*), ainsi que la structure du sol (par mesure de porosité). Ensuite, nous avons récolté l'ensemble des laitues des trois essais et mesuré le poids frais des parties aériennes et racinaires, la teneur en azote dans les feuilles et les racines ainsi que les traits biomécaniques des feuilles.

Brièvement, l'essai nous a permis de conclure qu'à la Serail sur le sol équilibré et à Manziat sur le sol sableux, de la même manière que dans le chapitre 2, l'ajout de procyanidines en champs induit un BDI, une conservation du nitrate dans le sol, une diminution de l'abondance des bactéries dénitrifiantes et une amélioration des traits de croissance des laitues. De plus, nous avons observé que l'ajout de la molécule n'induit pas de changement dans la structure des deux sols.

Malheureusement, suite à un problème de communication avec l'agriculteur du champ au sol à texture limoneuse (Montluel), où une forte dose d'engrais a été apportée sur l'ensemble de l'essai, nous n'avons pas pu dégager de résultats tant l'effet des engrais avait homogénéisé les différents traitements. Cependant, bien que l'ensemble des résultats sur ce champ ne sera pas présenté dans la suite, nous avons tout de même observé l'existence d'une diminution de l'activité de dénitrification sur ce sol limoneux lorsque l'on apporte des procyanidines et donc du BDI.

Ce chapitre nous permet de démontrer que l'ajout de procyanidines sur des cultures de laitues induit un BDI sur plusieurs types de sols et ne modifie pas la structure des sols. En comparant

l'essai salade (chapitre 2) avec ce deuxième essai salade (chapitre 3) nous pouvons conclure que la méthode d'application par pulvérisation sur des cultures de salades est répétable d'une année sur l'autre. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article qui a été soumis **au journal Plant and Soil**.

Biological inhibition of denitrification (BDI) in the field: effect on plant growth in two different soils

William Galland^{1,2}, Feth el Zahar Haichar², Sonia Czarnes², Celine Mathieu³, Jean-Louis Demorge³, Laurent Simon¹, Sara Puijalon¹ and Florence Piola¹.

¹Université de Lyon, UMR5023 LEHNA, Université Lyon 1, CNRS, ENTPE, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

²Université de Lyon, UMR 5557 LEM, Université Lyon 1, CNRS, INRA 1418, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

³Station d'Expérimentation Rhône-Alpes Information Légumes (SERAIL), 123 chemin du Finday Les Hoteaux – 69126 Brindas, France.

*Corresponding author: Galland William (galland.william@outlook.fr ; +33643028397) and Piola Florence (piola@univ-lyon1.fr ; +33472432955).

Keywords. Soil, denitrification, plant growth, soil texture and structure, lettuce

ABSTRACT

Aims Agriculture uses increasingly large amounts of nitrogen fertilizers to increase yields because nitrogen is a limiting factors of plant growth. Plants are in direct competition with denitrifying bacteria for nitrate, but biological denitrification inhibition (BDI) is a strategy developed by some plants in which procyanidins are produced that inhibit denitrification. This phenomenon increases the available nitrate in the soil. Previous results showed that the addition of procyanidins to lettuce fields induced BDI and increased soil nitrate and plant growth. However, agriculture is performed in different soils, and the hypothesis is whether procyanidins and BDI are effective on different soils.

Methods In this study, we tested the effect of procyanidin amendment on lettuce growth in two soils. To do this on both fields, we measured denitrification activities, nitrate levels and

the abundance of denitrification genes in the soil. In addition, we measured the morphological features of lettuce.

Results Our results show that in both soils, the addition of procyanidins causes inhibition of denitrification, an increase in available nitrate, counter-selection of denitrification communities and a gain in plant mass without modification of the soil structure.

Conclusions This study highlights a sustainable agricultural method effective in a variety of soils.

INTRODUCTION

In Europe, agriculture has expanded significantly over the past fifty years, following the development of phytosanitary products (Tilman et al. 2002) and especially nitrogen fertilizers, allowing an enhance in agricultural yields (Casagrande and Chapelle 2001) in different soils with variable nitrate and ammonium concentrations. Nitrogen depletion in soils is partly due to increasingly intense agricultural activity, where many successive crops consume the nitrogen initially present in the soil, without giving the ecosystem time to renew itself (Mulvaney et al. 2009). These practices therefore deprive plants and crops of nitrogen: the most important but above all the most limiting element for growth (Morot-Gaudry 1997), which leads farmers to use increasing amounts of nitrogen fertilizers (Tilman et al. 2002). These nitrogen fertilizers are used for intensive agriculture but are also transferred from the ecosystem or used by soil microorganisms (Kaye and Hart 1997). Indeed, nitrogen in European soils is not entirely consumed by plants and crops but is also subjected to denitrification, with 59% lost as the greenhouse gas N_2O ; leached into soils, representing a loss of 20%; and volatilized into NH_3 , representing a loss of up to 21% (Oenema et al. 2009). Ecological awareness led to the adoption in 1991 of a directive by the European Council to regulate the quantities of nitrogen added to the soil (1991: Directive 91/676/EEC; hereafter referred to as NiD). The main purpose of this nitrate directive was to reduce the risk of nitrogen leaching, but this does not reduce denitrification losses due to denitrifying bacteria in the soil. Indeed, denitrification by microorganisms, i.e., fungi (Philippot 2002), archaea (Shoun et al. 1992) and bacteria (Kuypers et al. 2018), transforms soil nitrate into N_2 and N_2O , with the latter greenhouse gas representing a significant loss for the ecosystem (Mosier et al. 1996).

However, [Bardon et al. \(2014\)](#) describes a phenomenon involving an invasive plant (*Fallopia spp*), which is able to inhibit denitrifying bacteria in the soil *via* exudation at the root level of a flavonoid tannin called procyanidin ([Bardon et al. 2016a](#)) and therefore reduce nitrogen losses by denitrification. This phenomenon, called biological denitrification inhibition (BDI), therefore reduces the activity and abundance of denitrifying bacteria and increases the nitrate pool in the soil, which can then be a source of nitrogen other than fertilizers for crops ([Bardon et al., 2016b](#)). Indeed, in [Galland et al. 2019](#), it was demonstrated that in sandy clay loam-textured soil, the addition of procyanidins to the field induced BDI, decreased the abundance of denitrifying communities and allowed nitrate conservation in the soil, which was then used for lettuce farming to increase lettuce growth. These crops, as well as BDI and denitrification, could be soil dependent. Indeed, in France, there is a great diversity of soils ([Jamagne 2011](#)), which differ from each other based on structure, i.e., the spatial arrangement of soil components ([Rabot et al. 2018](#)); texture, i.e., the granulometric distribution of soil mineral constituents ([Batey and McKenzie 2006](#)); and the bacterial community ([Nannipieri et al. 2003](#); [Fierer and Jackson 2006](#); [Schreiter et al. 2014](#)). These differences in soils play a role in the quality of crops but also in denitrifying bacterial communities. These bacteria may differ according to the soil and not have the same diversity and/or abundance, which may then change the use of nitrogen in the soil and its future in the soils ([Cavigelli and Robertson 2000](#)). In addition, the distribution of porosities based on soil structure can change the water content and oxygen availability ([Gliński et al. 2004](#)), which play a role in denitrification, which is an anaerobic process ([Kraft et al. 2011](#)). Thus, differences in soil based on texture, structure and bacterial communities, among other parameters, can modify denitrification and the effect of procyanidins on denitrification activity, which, similar to other organic molecules, exhibit variable behaviours and affinities depending on the soil with which they are in contact ([Lützow et al. 2006](#)). In this way, in this study, we aimed to test the effect of two different soils that theoretically do not have the same texture, structure and bacterial community on the action of procyanidins and consequently on BDI and traits related to lettuce growth. The assumption is that procyanidin amendment of any soil can induce BDI, which allows an increase in nitrate in the soil and thus an increase in the traits of lettuce. To test these hypotheses, two fields were used: one at the SERAIL Experimental Station (Brindas, 69126 Rhône, France), with a sandy clay loam soil texture, and an agricultural field in Manziat (01570 Ain, France), where the soil has a loamy sand texture. During the summer of 2018, the same variety of Batavia

lettuce was planted in both fields in parallel, and the planted and unplanted soils were amended with procyanidins at three concentrations (0, 87 and 210 kg ha⁻¹). Soil denitrification enzyme activity (DEA), soil nitrate concentration, shoot and root morphological traits (fresh masses of aerial and root parts, biomechanical characteristics of leaves and the nitrogen content of tissues), the abundance of total bacteria and the denitrifying community, and the porosities of the soils used were measured in lettuce and soil with or without procyanidin amendment.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth and experimental design

Lettuce (*Lactuca sativa* var Loubresac, Earl LIMOUSIN) was grown in two fields at the same time in July 2018 following a Fisher system with 4 plots per treatment (Preece 1990); the fields were located in an agricultural field in Manziat (01570 Ain, France) (46°22' 2.28 "N, 4°54' 3.671 "E) with loamy sand soil (sand: 82.5%, silt: 8.9% and clay: 8.5%; cation exchange capacity (CEC): 60 meq kg⁻¹; organic carbon: 9.9 g kg⁻¹) and at the SERAIL Experimental Station (Brindas, 69126 Rhône, France) (45°43'46.4 "N, 4°43'37.1 "E) with a sandy clay loam soil (sand: 68.7%, silt: 21.9% and clay: 9.5%; CEC: 58 meq kg⁻¹; organic carbon: 6.9 g kg⁻¹). In both fields, the experimental design was the same: lettuce was planted in 4 parallel rows of 20 lettuces in 6 m x 1.4 m plots (8.4 m²), with an unplanted area of 2 m x 1.4 m (2.8 m²) for measuring the corresponding characteristics of soil without plants. For soils with or without lettuce, 3 treatments were applied: unamended with procyanidins and amended with procyanidins at the two concentrations found to be most effective in Galland et al. (2019): 87 kg ha⁻¹ and 210 kg ha⁻¹. The two experiments were watered the first week after planting with 3 mm of water every day. For the next 10 days, 8 mm of water was applied per day. From then until the end of the experiment, 12 mm of water was applied every two days. Procyanidins were added 2 weeks after planting (stage with 7-9 leaves) to soil whose nitrate had been brought to the ZENIT grid standard, i.e., 40 kg NO₃⁻ ha⁻¹ (Despujols 1997). Commercial procyanidins (Laffort TANIN VR GRAPE ®112, Bordeaux, France) were applied in aqueous solution (standard water) by 2 nozzle spray booms to provide 500 L ha⁻¹ or 0.42 L per plot, between the rows of lettuce, and the soil was then hoed. Each site was binned and slightly watered (with 8 mm) just after the addition of procyanidins.

Denitrification Enzyme Activity (DEA)

Briefly, as described by [Galland et al. \(2019\)](#), DEA was measured for both fields from 5 g dry equivalent of pooled root-adhering soil (RAS) retrieved from 4 lettuces per plot and 4 samples of bulk soil from unplanted plots with or without amendment. BDI (%) was measured by calculating the percentage of denitrification activity inhibition recorded by DEA compared to the corresponding unamended control.

Quantification of total bacterial and denitrifier abundance

Total DNA was extracted from 0.5 g of RAS from three treatments (unplanted soil, soil with lettuce, and soil with lettuce amended with only the higher concentration of 210 kg of procyanidins per hectare) in triplicate according to the manufacturer's protocol with a Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Solon, OH, USA). The amount of DNA extracted was then estimated using a Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay kit (Molecular Probes, USA). Total bacterial and denitrifier abundances were quantified by qPCR using primers targeting the 16S rRNA and *nirK/nirS* genes, respectively, as described previously by [Galland et al. \(2019\)](#).

Nitrate concentrations in soil

Briefly, NO_3^- was extracted one week before procyanidin application (T0) from the planted rhizospheric soils (20 cm from the base of 4 lettuces per plot and pooled) and on the day of harvest (TF) from the RAS soils and from the unplanted soils for both fields. Nitrate was extracted from 5 g eq. of dried soil according to ([Galland et al. 2019](#)).

Measurement of lettuce mass

After 5 weeks of growth in the Manziat field and 6 weeks of growth in the SERAIL field, 12 lettuces per plot or 48 lettuces per treatment were harvested and weighed to determine the fresh mass of the aerial parts. Among these 12 lettuces, 4 root systems were harvested (or 16 per treatment) to determine the mass of the root parts. Each fresh lettuce was weighed on a balance (± 0.5 g). The root system was washed with distilled water and weighed with a

precision balance (± 0.001 g), dried at 68°C for 24 h and weighed again on the same balance in order to determine dry mass.

Leaf mechanical properties

One piece of tissue was cut from each leaf (4 leaves per plot for a total of 16 leaves per treatment in each field) for biomechanical measurements. Specific leaf toughness was measured in accordance with [Galland et al. \(2019\)](#).

Plant N content

As described in [Galland et al. \(2019\)](#), the total N concentration was measured using an elemental analyser (FlashEA 1112, Thermo Scientific, Waltham, USA) from 4 leaves and 4 root systems per plot (16 per treatment in each field) using 2 mg of ground root or leaf. The leaf and/or root N contents was expressed in percentage of N in the leaf and/or root dry mass.

Soil porosity measurement

For each treatment, to determine volumetric soil water moisture after capillary rise and bulk density, four undisturbed soil samples were collected using a stainless steel cylinder of 100 cm³ (5.6 cm diameter, 4.05 cm height) with bevelled edges to ease insertion from unplanted soil or rhizospheric soil. The core samples were capped at both ends with two plastic lids to minimize soil and evaporative loss until analysis. After removing the two plastic lids, the core samples were placed on a geotextile. This geotextile had the ability to let water but not soil particles pass through. The geotextile was placed on a PVC rigid support with large mesh. The geotextile was 3 cm from the bottom of large plastic bowls. Water was added to the plastic bowls until the level of water obtained was 2 mm higher than the bottom of the base of the core samples. The bowls were closed to prevent evaporation during the time of the experiment (approximately 34 h), and volumetric soil moisture after capillary rise and bulk density were then determined in the 100 cm³ cylindrical soil cores (V) by successive weighing of the wet and 105°C-oven-dried soil cores. The volumetric soil water content after water capillary rise represents the water retained in the aggregates by capillary forces and the

'immobile' water, which moves slowly through the network of micropores ([Chen et al. 1993](#)) and fills capillary pores occurring within soil aggregates. The micropores between particles and microaggregates belonging to the elementary fabric units are referred to as capillary porosity in this paper. Capillary porosity, expressed in $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$, was estimated by subtracting the 105 °C-oven-dried soil weight from the wet soil weight and normalizing the difference to the 105 °C-oven-dried soil weight and the volume of the cylindrical soil cores (V) thereafter. The bulk density of each soil core was determined as the ratio between the total 105 °C-oven-dried soil weight and the soil cylinder volume V. The total porosity was calculated from the bulk density and solid density thereafter (assuming that the solid density was 2.65 g cm^{-3}). Macropores between the units of fabric, referred to as macroporosity and expressed in $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$, represent the rapid water transport and aeration of the soil. Macroporosity was calculated as the difference between total porosity and capillary porosity.

Data and statistical analyses

The difference in lettuce morphological traits ($n > 48$) between treatments was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc (Tukey's HSD) test. Similarly, the normality (Shapiro test) and homoscedasticity of the variance (Fischer test) of all the variables were tested. The significance of microbiological traits, nitrate concentration, soil measurement and nitrogen level in plant ($n > 3$) between treatments was tested non-parametrically with a Kruskal-Wallis test followed by a post hoc Nemenyi test. The same statistical tests were used to measure the differences between equivalent treatments and between the two fields, and the plot effect was tested and discarded for all traits (two-way ANOVA and mixed model). All the analyses were performed using R project software (v. 3.5.0).

RESULTS

Biological denitrification inhibition

As shown in Figure 1, in soil from the Manziat field with 87 kg ha⁻¹ procyanidin amendment, a significant BDI of approximately 31% (p-value: 0.014) was observed compared to the unplanted soil without procyanidin addition. However, no significant BDI was observed in response to the 210 kg ha⁻¹ procyanidin amendment. In the soil planted with lettuce, no significant BDI with the 87 kg ha⁻¹ procyanidin amendment compared to the planted soil without procyanidin amendment was observed, whereas significant BDI (p-value: 0.03) of approximately 31% was observed for the highest concentration (210 kg ha⁻¹). In the unplanted soil in the SERAIL field, there was BDI in the plots amended with 87 and 210 kg ha⁻¹ procyanidins of 24% and 32%, respectively (p-value: 0.048), compared with the unamended soil. In addition, in planted soils, there was BDI of 27% (p-value: 0.047) relative to unamended planted soil for the 87 kg ha⁻¹ procyanidin-amended lettuce and soils and significant BDI of 33% (p-value: 0.04) for the 210 kg ha⁻¹ procyanidin-amended lettuce and plots. When comparing both fields, we noticed that in the unplanted and planted soil, BDI was induced for each tested concentration and was more important at the highest concentration, except for the BDI observed in unplanted and amended soil with procyanidin addition of 87 kg ha⁻¹, where the BDI was larger and different from than in planted soil planted with the same procyanidin concentration.

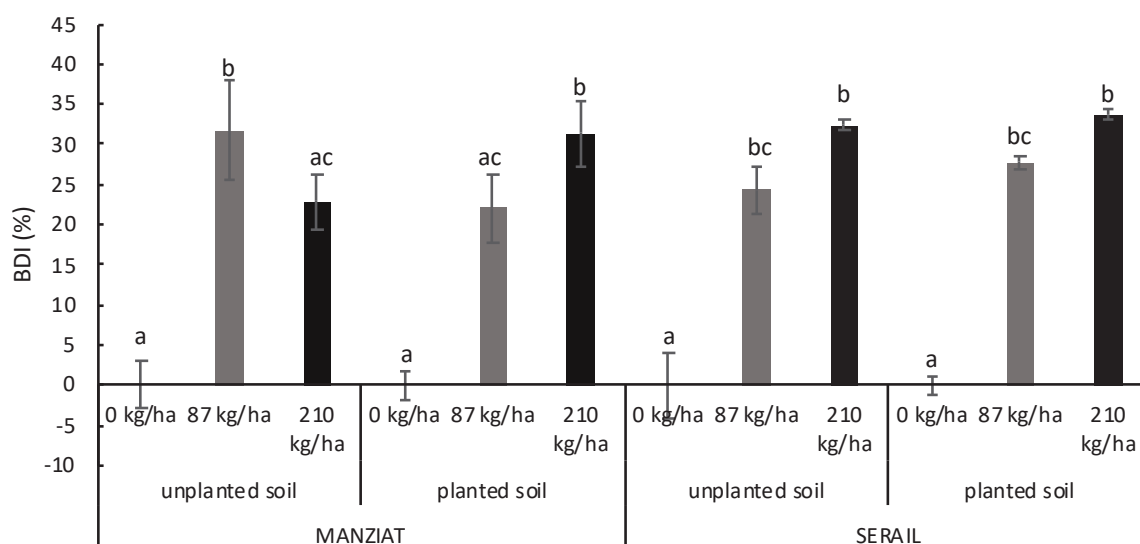


Figure 1: Effects of different concentrations of procyanidins (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) applied to unplanted soil and soil planted with lettuces in the Manziat field on the left and the SERAIL field on the right on biological denitrification inhibition (BDI, % in relation to the corresponding untreated soil) by communities colonizing the root-adhering soil of treated lettuces. n=4 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate a difference between treatments (Nemenyi test; $\alpha < 0.05$).

Abundance of total and denitrifying bacterial communities

In the Manziat and SERAIL fields, the total bacterial communities measured by the 16S rRNA gene (Fig. 2A) did not differ statistically between treatments, although there was a tendency at the SERAIL field for the total bacterial abundance to be reduced in the presence of lettuce plants. In the Manziat field, the abundance of the *nirS* gene (Fig. 2B) was identical in the unamended soil and in the RAS of unamended lettuce and amended lettuce at 210 kg ha⁻¹ procyanidins. However, the abundance of the *nirS* gene was lower in lettuce amended with 210 kg ha⁻¹ procyanidins than in unamended lettuce. In the SERAIL field (Fig. 2B), there were generally fewer bacteria harbouring the *nirS* gene than in the Manziat field, although the abundance of the community with the *nirS* gene in the RAS soil of unamended lettuces was identical to that in the unamended and planted soil. The abundance of *nirS* genes was significantly higher in the unamended soil than in the RAS of lettuce amended with procyanidins at 210 kg ha⁻¹ (p-value: 0.018). In Manziat, the abundance of bacteria harbouring the *nirK* gene (Fig. 2C) was identical between unplanted soil and unamended planted soil but

significantly lower in planted soils amended with procyanidins (p-value: 0.013). At SERAIL, the abundance of the *nirK* gene (Fig. 2C) was significantly higher in unplanted soil (p-value: 0.0229) than in planted soil with or without procyanidins. The amendment of procyanidins slightly reduced the abundance of bacteria in the RAS of lettuce but not significantly compared to the RAS of unamended lettuce.

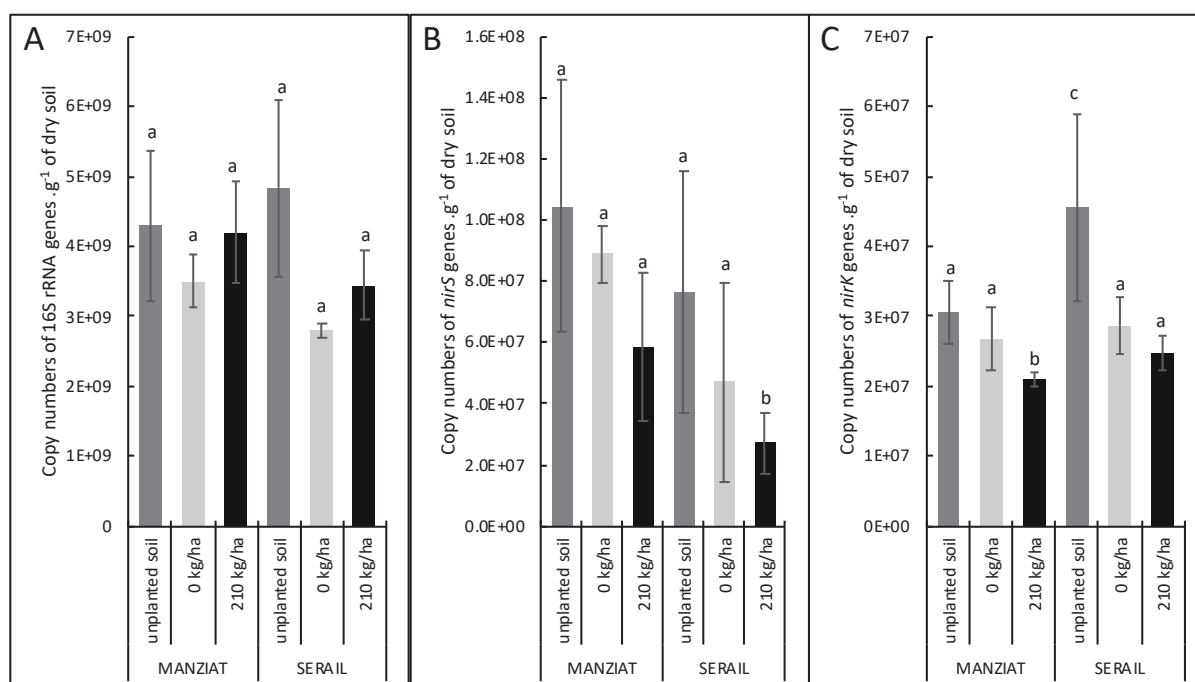


Figure 2: Effects of procyanidins applied to the Manziate and SERAIL fields (210 kg of procyanidins per hectare) to unplanted soil and soil planted with lettuces on the (A) whole bacterial community (copy numbers of 16S rRNA g⁻¹ of dry soil), (B) denitrifying bacteria (copy numbers of *NirS* g⁻¹ of dry soil), and (C) denitrifying bacteria (copy numbers of *NirK* g⁻¹ of dry soil), with n = 3 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate different means (Nemenyi test, $\alpha < 0.05$).

Effect of procyanidin addition to soil on nitrate concentrations

In the Manziate field on date T0 (Fig. 3A), nitrate concentrations were equivalent for unplanted soils and similar for planted soils. In addition, the nitrate concentrations in planted soils were significantly lower than those in unplanted soils. On the TF date, overall, the nitrate concentrations of the planted soils were significantly lower than those of the unplanted soils. However, at 87 kg ha⁻¹, the nitrate concentration in unplanted soil was significantly increased by 113 % (p-value: 0.05) compared to that in unplanted and unamended soil. Moreover, the

nitrate concentration was not significantly different (59 % higher in unplanted and amended soil at 210 kg ha⁻¹). In all treatments, there was a decrease in the nitrate concentration between T0 and TF, except for soils unplanted and amended with 87 or 210 kg ha⁻¹ procyanidins. In the SERAIL field (Fig. 3B), the nitrate concentrations at T0 were identical between planted soils, but not in the unplanted soil without amendment, in which the concentration was significantly lower (p-value: 0.041). In addition, there was no difference in the nitrate concentration in unplanted soils regardless of the concentration at T0. At TF, the nitrate concentrations in planted soils were identical, regardless of the concentration, and significantly lower than those in unplanted soils. In unplanted soils, the nitrate concentration of the soil amended with 87 kg ha⁻¹ procyanidins was significantly higher than the concentration of the unplanted soil amended with 210 kg ha⁻¹ procyanidins (p-value: 0.047) and 142 % higher than that in the unplanted and unamended soil (p-value: 0.046). Similarly, the nitrate concentration of the soil amended with procyanidins at 210 kg ha⁻¹ was significantly higher (by approximately 57 %) than that of untreated soil (p-value: 0.049). It should be noted that between T0 and TF, all nitrate concentrations decreased except for that in the unplanted and unamended soil and the unplanted soil with amendment at 87 kg ha⁻¹.

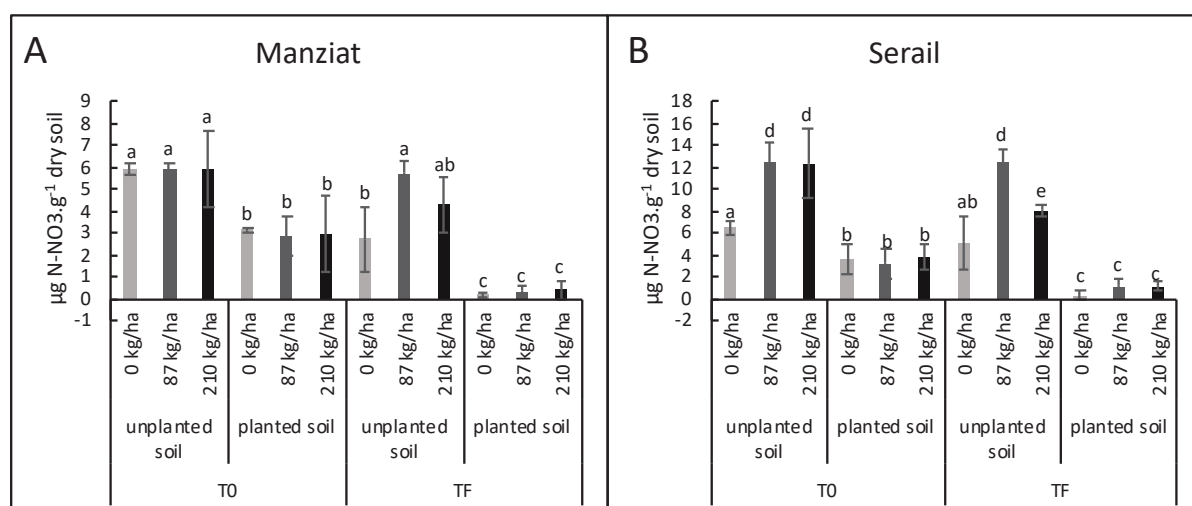


Figure 3: Effects of different concentrations of procyanidins applied to the field (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) of A) Manziat and B) SERAIL on the nitrate concentration of unplanted soil and soil planted with lettuce (rhizospheric soil), measured at time 0 (T0) and the final time (TF). n = 4 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate a difference between treatments (Nemenyi test; $\alpha < 0.05$).

Effect of procyanidin addition on lettuce traits

In Manziat (Fig. 4A), the addition of 87 kg ha⁻¹ and 210 kg ha⁻¹ procyanidins significantly increased the fresh mass of the aerial parts of lettuce by 46% (p-value: 0.00012) and 33% (p-value: 0.025), respectively, compared to unamended lettuce. Similarly, at SERAIL (Fig. 4A), compared to the fresh mass of unamended lettuce, that of lettuce with the addition of procyanidins increased by 16% (p-value: 0.092) with 87 kg ha⁻¹ and 25% (p-value: 0.00053) with 210 kg ha⁻¹. In Manziat (Fig. 4B), amendment with procyanidins at 87 kg ha⁻¹ allowed a significant increase (p-value: 0.0000026) in the fresh mass (approximately 73%) of roots compared to no amendment. At SERAIL (Fig. 4B), amendment with 87 kg ha⁻¹ procyanidins allowed an increase (p-value: 0.15) in the root fresh mass (approximately 22%), and amendment with 210 kg ha⁻¹ procyanidins allowed a significant increase (p-value: 0.017) in the fresh mass (approximately 28%) of roots compared to no amendment. Moreover, the specific toughness (J.m⁻³) of the three leaves of the 4th crown did not differ between treated and untreated lettuces in either field (Fig. 5). However, overall, the specific toughness of the leaves of the 4th crown in Manziat was higher than that at SERAIL.

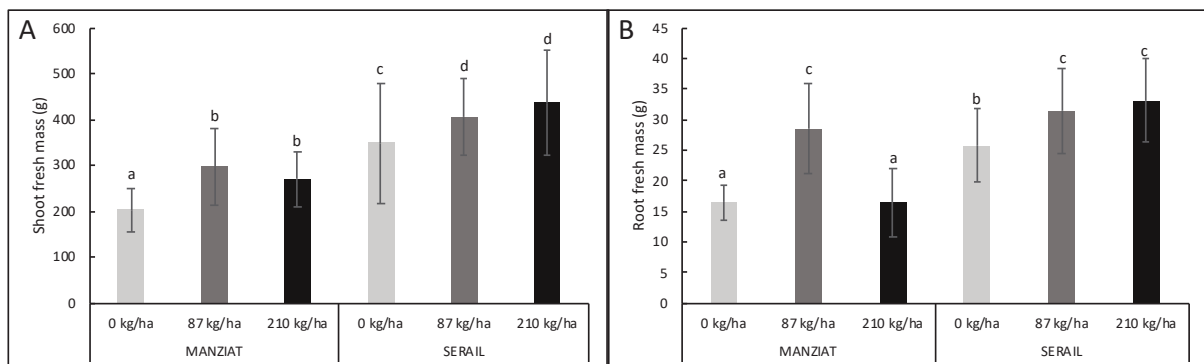


Figure 4: Effects of different concentrations of procyanidins applied to soil planted with lettuces in the Manziat field (left) and the SERAIL field (right) (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) on the fresh mass of (A) shoots (g) and (B) roots (g). n= 16 for the root system and n= 48 for the shoots in each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate a difference between treatments (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

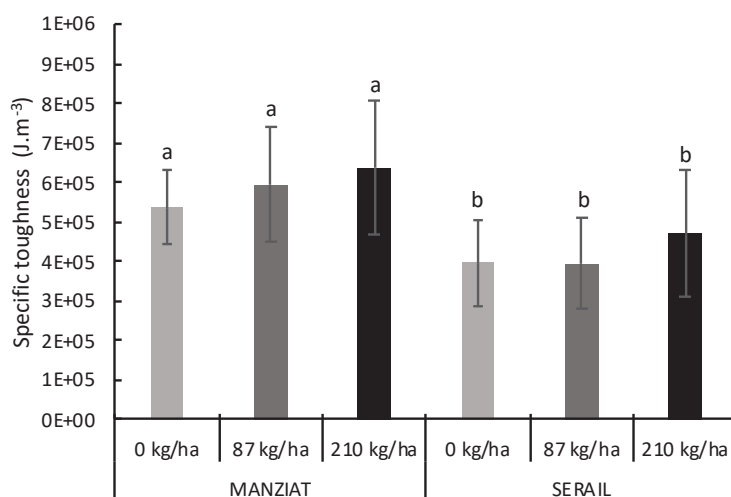


Figure 5: Effects of different concentrations of procyanidins applied to soil planted with lettuces in the Manziat field (left) and the SERALIL field (right) (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) on specific toughness (J.m⁻³). n = 16 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate a difference between treatments (Tukey's test; α<0.05).

Nitrogen concentration in plants

In Manziat and at SERALIL (Fig. 6A), the nitrogen content in the leaves of amended lettuce was the same, regardless of whether they were amended. However, the nitrogen content seems to decrease from 2.1 to 1.8 % of nitrogen with the amendment concentration. Based on the gains in fresh mass of the aerial parts of the lettuces, we can deduce that there was, on average, 1.46 g more nitrogen per lettuce for the treatment with 87 kg ha⁻¹ procyanidins and 0.63 g more nitrogen for the treatment with 210 kg ha⁻¹ procyanidins than in unamended lettuces. Similarly, in the SERALIL field, there was, on average, 0.94 g more nitrogen per lettuce with 87 kg ha⁻¹ procyanidins and 0.56 g with 210 kg ha⁻¹ procyanidins than in unamended lettuces. In Manziat (Fig. 6B), the nitrogen content in lettuce roots between treatments was the same. At SERALIL, although not significantly different, the nitrogen concentrations seemed lower when lettuce was amended with procyanidins.

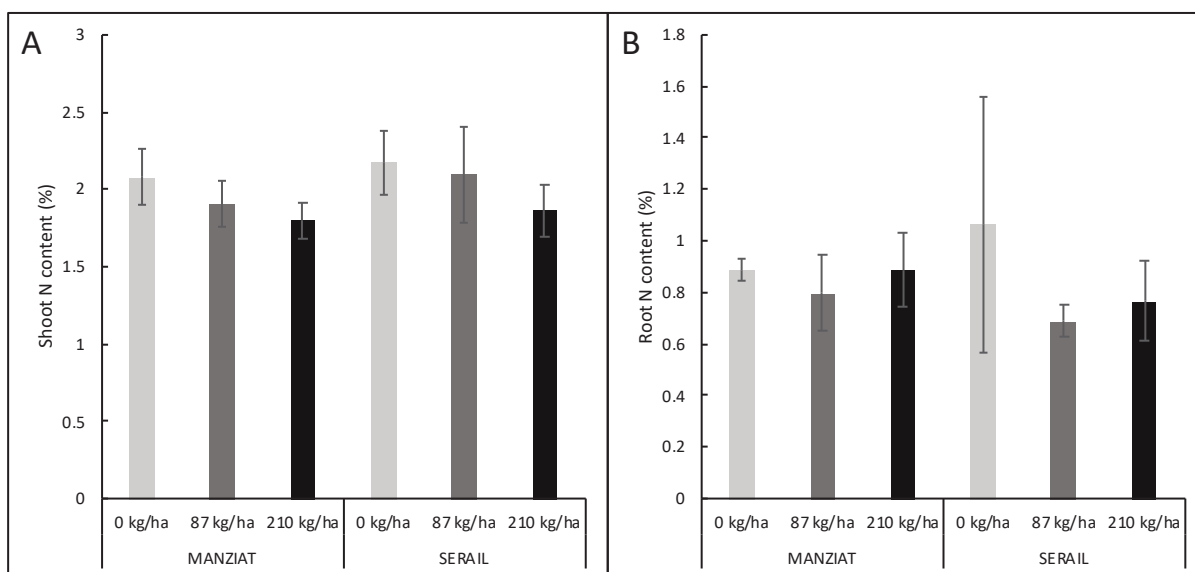


Figure 6: Effects of different concentrations of procyanidins applied to soil planted with lettuces in the Manziat field (left) and the SERAIL field (right) (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) on the (A) leaf and (B) root N content (% of dry mass). $n = 4$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. No significant effect (Nemenyi test; $\alpha < 0.05$).

Effect of procyanidins addition on soil porosities

In Manziat, procyanidin amendment of planted and unplanted soils did not significantly change the total porosity (Fig. 7A) or the capillary porosity (Fig. 7C). However, the macroporosity (Fig. 7E) of the planted soil amended with procyanidins at 87 kg ha⁻¹ was significantly lower than the macroporosity of the unamended planted soil (p -value: 0.0083572), and although not significant, it was also lower in the planted soil amended with 210 kg ha⁻¹ procyanidins. At SERAIL, procyanidin amendment of planted and unplanted soils did not change the total porosity (Fig. 7B), capillary porosity (Fig. 7D) or macroporosity (Fig. 7F).

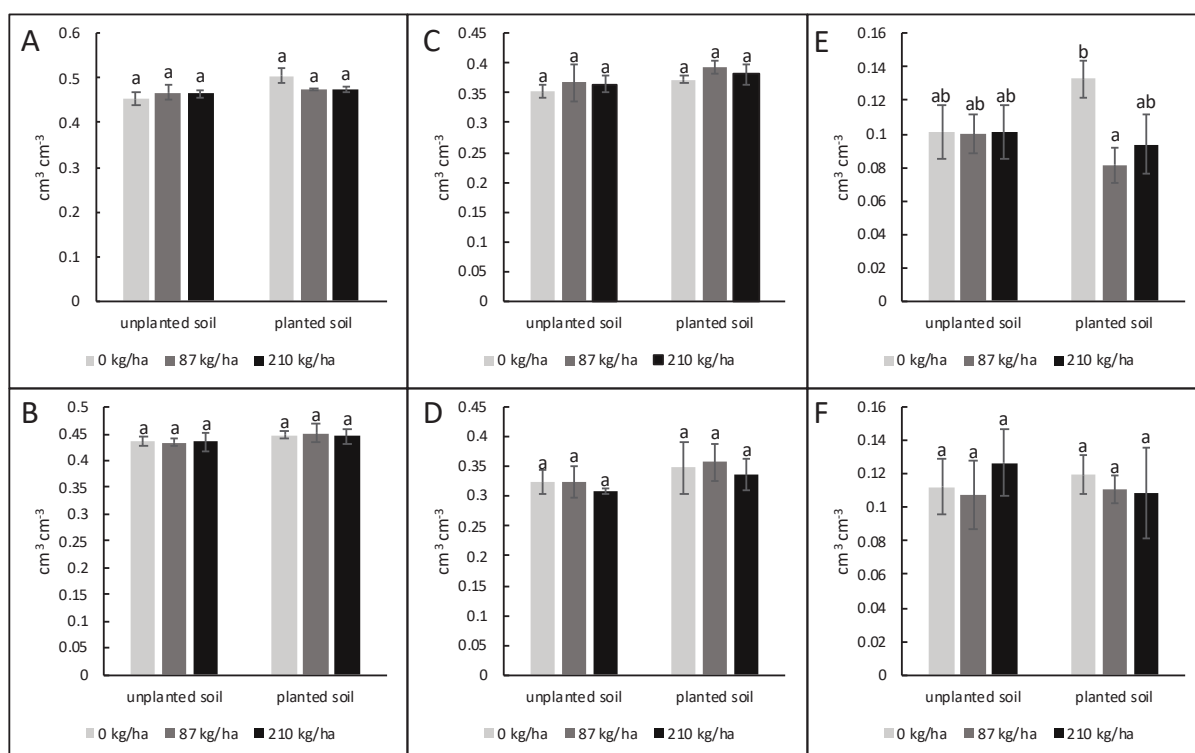


Figure 7: Effects of different concentrations of procyanidins applied to unplanted soil and soil planted with lettuces (0, 87 and 210 kg of procyanidins per hectare) on: total porosity ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) in the Manziat field (A) and SERAIL field (B); capillary porosity ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) in the Manziat field (C) and SERAIL field (D) and macroporosity ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$) in the Manziat field (E) and SERAIL field (F). $n = 4$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different letters indicate a difference between treatments (Nemenyi test; $\alpha < 0.05$).

DISCUSSION

The addition of procyanidins induces BDI in soils of both textures

As demonstrated in [Galland et al. 2019](#), the addition of procyanidins to lettuce fields reduced denitrification activity. This reduction was observed for both soil textures. In the SERAIL field with a sandy clay loam-textured soil (the same soil as used in [Galland et al. 2019](#)), the addition of procyanidins induced BDI from one year to the next, on the same orders of magnitude (between 16 and 32%, depending on the procyanidin concentrations in the soil). In addition, the results presented here showed that denitrification activity was also inhibited by the addition of procyanidins to the loamy sand soil of Manziat, and the inhibition percentages in

the planted soils were the same between the two fields used in the experiment; the higher the concentration of procyanidins, the higher the BDI. In unplanted soil at SERAIL, BDI was on the same order of magnitude as that in planted soil and higher when the dose was high, but in the unplanted soil in the Manziat field, the smallest concentration induced greater BDI. Each plant selects its antagonistic microorganisms, as described by [Berg and Smalla \(2009\)](#), which would explain in our case the decrease in the abundance of the total bacterial community in the RAS of lettuce with or without procyanidins in the SERAIL field, although as shown by [Buyer et al. \(2002\)](#), plants such as soybean and corn increase the total community. This phenomenon was not observed in [Galland et al. \(2019\)](#) because, as [Dandie et al. \(2008\)](#) shows, bacterial communities in arable soil are likely to change from one year to the next. However, the abundance of the total bacterial community did not differ between the RAS of lettuce amended or unamended with procyanidins for either soil texture, which indicates that the addition of procyanidins did not have an antimicrobial effect on the soil microfauna, as shown by [Lacombe et al. \(2012\)](#), in which a procyanidin concentration much higher than that used here had antimicrobial effects on some bacterial species. However, procyanidins act on the abundance of denitrifying bacterial communities. As described by [Wallenstein et al. \(2006\)](#), denitrifying bacterial communities have either copper-coupled nitrate reductase (encoded by *nirK*) or copper-coupled nitrate reductase (encoded by *nirS*), which is why we targeted these two genes to measure denitrifier abundance. Thus, at a procyanidin concentration of 210 kg ha⁻¹, whether in sandy clay loam or loamy sand, denitrifying communities with the *nirK* gene and the *nirS* gene were less abundant in procyanidin-amended soil than in unamended soil, identical to the result in [Galland et al. \(2019\)](#), despite the fact that denitrifying communities can change from one year to the next, as [Yoshida et al. \(2009\)](#) showed. This leads to the hypothesis that the loss of the denitrifying function of bacteria *via* the BDI phenomenon would cause a lack of competitiveness and would thus be counter-selected from the rhizosphere of amended lettuce. Denitrifying bacteria could no longer use nitrate as an electron acceptor, which would reduce their multiplication and persistence in the ecological niche of the rhizosphere, as observed in [Dassonville et al. \(2011\)](#). We also observed that the abundances were not the same between the two soil textures; there were more bacteria in the loamy sand soil of Manziat with the *nirS* gene and fewer with the *nirK* gene than at the SERAIL, as [Rosa et al. \(2014\)](#) showed, indicating that the distribution of denitrifier diversity is not the same among soils.

The addition of procyanidins induces nitrate conservation and an increase in lettuce morphological traits for both soil textures

[Bardon et al. \(2017\)](#) showed in mesocosms that in a soil with a sandy clay loam texture, procyanidin-induced BDI allows nitrate conservation in the soil of up to 6 times compared to that in the same soil that has not been amended with procyanidins. In our experiment, there were similar nitrate conservations in both soils at both concentrations, which were homogeneous between the two soils: at 87 kg ha⁻¹ procyanidin, the sandy clay loam soil at the SERAIL exhibited 58% nitrate conservation compared to the unplanted and unamended soil, and the loamy sand soil of Manziat exhibited 52% nitrate conservation; at 210 kg ha⁻¹ procyanidin, conservations of 36% at the SERAIL and 37% at Manziat were observed. This conservation after BDI allowed the lettuces to grow better in the amended soils, as observed in the previous year with another variety of lettuce. In our case, after adding procyanidins, we observed that in the planted soils in the two fields, lettuce consumed the nitrate present in the soil between the beginning and the end of the experiment, as [Jackson et al. \(1994\)](#) observed in lettuces that use nitrate as the preferred source of nitrogen during growth. In addition, in the unplanted soils of the two fields, there was a loss of nitrate between the first measurement at the beginning of the experiment and the second measurement taken at harvesting. Such loss over time is due to nitrogen losses in the system such as leaching ([Di and Cameron 2002](#)), denitrification ([Kuypers et al. 2018](#)) and volatilization ([Jadon et al. 2018](#)), but this loss was less significant when soils were amended with procyanidins, as expected. Indeed, in these two soils, although lettuce yield varies depending on soil texture ([Costigan 1986](#)), the supply of procyanidins induced BDI, which allowed an increase in nitrate in the soil and induced a gain in lettuce mass in the amended plots. Indeed, in loamy sand soil, we observed a mass gain of 46 and 33% in lettuces amended with procyanidins at 87 and 210 kg ha⁻¹ compared to unamended lettuces, respectively, and similar mass gains of 16 and 25% in those amended with procyanidins at 87 and 210 kg ha⁻¹, respectively. As in [Galland et al. \(2019\)](#), there was a greater root mass gain than aerial mass gain for lettuce roots in Manziat. Indeed, these traits exhibited a 78% increase in response to procyanidin amendment at 87 kg ha⁻¹ when the aerial parts increased by 46%, whereas the previous study ([Galland et al. 2019](#)) discriminated against the direct action of procyanidins on the roots, and this effect was assumed to be due solely to the BDI phenomenon. It can therefore be deduced that

procyanidin amendment at 87 kg ha⁻¹ is sufficiently effective in loamy sand soil, while a higher concentration (such as 210 kg ha⁻¹) is more effective in sandy clay loam soil. It was also observed that the percentages of nitrogen in tissues did not differ between amended and unamended lettuce for either soil texture, meaning that there was no plant physiological change due to the procyanidin amendment allowing better nitrogen absorption by the lettuce. However, as lettuce grew better in plots amended with procyanidins in both fields, the higher the mass, the higher the nitrogen concentration. Indeed, the procyanidin treatment made it possible to conserve nitrogen in the form of nitrate due to BDI and thus to make more nitrate available for lettuce, allowing better growth without modifying the plants' ability to absorb nitrogen. This observation is consistent with the finding of a greenhouse study conducted on several lettuce varieties where nitrogen use efficiency was not affected by soil nitrate concentrations (Urlić et al. 2017). Similarly, although the specific toughness of lettuce leaves was higher in Manziat, which was probably due to different growing conditions and the fact that they were smaller in this soil, amending lettuce with procyanidins did not change the quality of the leaves. Thus, treatment with procyanidins does not change the vulnerability of leaves to potential herbivores and pests (Clissold et al. 2009; Onoda et al. 2011) and does not lead to a gustatory quality difference detected by consumers for lettuce potentially placed on the market (Lopez-Galvez et al. 1997; Rico et al. 2007).

The addition of procyanidins did not induce a change in soil structure

The measurement of soil porosity was carried out because soil structure plays a role in denitrification (Laudone et al. 2011). In fact, the porosity of a soil is linked to soil aeration and therefore to anaerobic conditions that are favourable for denitrification (Smith 1990). Moreover, denitrifiers are more abundant in aggregates than in pores (Lecomte et al. 2018). Therefore, a change in porosity between our two soils may have played a role in the denitrification activity and consequently the inhibition of it by BDI. However, since two soils with different textures necessarily do not have the same structure (Bouma 1991), it is normal for the total porosity to be slightly lower in sandy clay loam soil than in loamy sand soil. Despite this, there was no difference in the efficiency of BDI, nitrate availability or the efficiency of lettuce cultivation, suggesting that the BDI process is independent of soil structure. However, we observed a decrease in the macroporosity of planted soils amended with 87 kg of procyanidins per hectare, potentially due to the significant root growth under this condition.

In addition, as Hamblin (1986) explains, roots can, by growing, compact the soil and thus reduce macroporosity. Thus, soil porosities differed only slightly between treatments for both soils, which means that regardless of soil texture or structure, the induction of BDI in fields is applicable in two soil types and repeatable from one year to the next with another variety of lettuce.

Acknowledgements

This work was supported by the Auvergne-Rhône-Alpes region (ARC 2016-2019) for thesis subvention. Quantitative PCR was performed on the DTAMB platform (FR BioEnvis, University Lyon 1). Field experiments were performed at the SERAIL station. Microbial activities were measured on the AME platform (UMR 5557), and C and N content were measured on the Isotope Ecology platform (UMR 5023). We thank Laurent Philippot and Delphine Moreau for scientific discussions.

References

- Bardon C, Piola F, Bellvert F, et al (2014) Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. *New Phytol* 204:620–630
- Bardon C, Piola F, Haichar FZ, et al (2016a) Identification of B-type procyanidins in *F. allopia* spp. involved in biological denitrification inhibition. *Environ Microbiol* 18:644–655
- Bardon C, Poly F, el Zahar Haichar F, et al (2017) Biological denitrification inhibition (BDI) with procyanidins induces modification of root traits, growth and N status in *Fallopia x bohemica*. *Soil Biol Biochem* 107:41–49
- Bardon C, Poly F, Piola F, et al (2016b) Mechanism of biological denitrification inhibition: procyanidins induce an allosteric transition of the membrane-bound nitrate reductase through membrane alteration. *FEMS Microbiol Ecol* 92:
- Batey T, McKenzie DC (2006) Soil compaction: identification directly in the field. *Soil Use Manag* 22:123–131
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13
- Bouma J (1991) Influence of soil macroporosity on environmental quality. In: *Advances in agronomy*. Elsevier, pp 1–37
- Buyer JS, Roberts DP, Russek-Cohen E (2002) Soil and plant effects on microbial community structure. *Can J Microbiol* 48:955–964

- Casagrande P, Chapelle C (2001) Fertilisation azotée minérale: assagissement à la fin des années 80. *Agreste Cah* 2:3–10
- Cavigelli MA, Robertson GP (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81:1402–1414
- Chen C, Thomas DM, Green RE, Wagenet RJ (1993) Two-domain estimation of hydraulic properties in macropore soils. *Soil Sci Soc Am J* 57:680–686
- Clissold FJ, Sanson GD, Read J, Simpson SJ (2009) Gross vs. net income: how plant toughness affects performance of an insect herbivore. *Ecology* 90:3393–3405
- Costigan PA (1986) The effects of soil type on the early growth of lettuce. *J Agric Sci* 107:1–8. doi: 10.1017/S0021859600066727
- Dandie CE, Burton DL, Zebarth BJ, et al (2008) Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. *Appl Env Microbiol* 74:5997–6005
- Dassonville N, Guillaumaud N, Piola F, et al (2011) Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biol Invasions* 13:1115–1133
- Despujols J (1997) Control of nitrate level in autumn greenhouse lettuce. *Infos CTIFL Fr*
- Di HJ, Cameron KC (2002) Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutr Cycl Agroecosystems* 64:237–256
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci* 103:626–631
- Galland W, Piola F, Burlet A, et al (2019) Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: A strategy to improve plant nutrition and growth. *Soil Biol Biochem* 136:107513. doi: 10.1016/j.soilbio.2019.06.009
- Gliński J, Brzezińska M, Włodarczyk T (2004) Microbial ecology of soil porous medium. *SOIL–PLANT–ATMOSPHERE AERATION Environ Probl* 65
- Jackson LE, Stivers LJ, Warden BT, Tanji KK (1994) Crop nitrogen utilization and soil nitrate loss in a lettuce field. *Fertil Res* 37:93–105
- Jadon P, Selladurai R, Yadav SS, et al (2018) Volatilization and leaching losses of nitrogen from different coated urea fertilizers. *J Soil Sci Plant Nutr* 0–0
- Jamagne M (2011) Grands paysages pédologiques de France. Éditions Quae
- Kaye JP, Hart SC (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends Ecol Evol* 12:139–143
- Kraft B, Strous M, Tegetmeyer HE (2011) Microbial nitrate respiration—genes, enzymes and

- environmental distribution. *J Biotechnol* 155:104–117
- Kuypers MM, Marchant HK, Kartal B (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* 16:263
- Lacombe A, Wu VC, White J, et al (2012) The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiol* 30:124–131
- Laudone GM, Matthews GP, Bird NRA, et al (2011) A model to predict the effects of soil structure on denitrification and N₂O emission. *J Hydrol* 409:283–290
- Lecomte S, Achouak W, Abrouk D, et al (2018) Diversifying anaerobic respiration strategies to compete in the rhizosphere. *Front Environ Sci* 6:139
- Lopez-Galvez G, Peiser G, Nie X, Cantwell M (1997) Quality changes in packaged salad products during storage. *Z Für Leb -Forsch A* 205:64–72
- Lützw M v, Kögel-Knabner I, Ekschmitt K, et al (2006) Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions—a review. *Eur J Soil Sci* 57:426–445
- Morot-Gaudry J-F (1997) Assimilation de l’azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Editions Quae
- Mosier AR, Duxbury JM, Freney JR, et al (1996) Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation. In: *Progress in nitrogen cycling studies*. Springer, pp 589–602
- Mulvaney RL, Khan SA, Ellsworth TR (2009) Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *J Environ Qual* 38:2295–2314
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, et al (2003) Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54:655–670
- Oenema O, Witzke HP, Klimont Z, et al (2009) Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agric Ecosyst Environ* 133:280–288
- Onoda Y, Westoby M, Adler PB, et al (2011) Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecol Lett* 14:301–312. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01582.x
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta BBA-Gene Struct Expr* 1577:355–376
- Preece DA (1990) RA Fisher and experimental design: a review. *Biometrics* 925–935
- Rabot E, Wiesmeier M, Schlüter S, Vogel H-J (2018) Soil structure as an indicator of soil functions: a review. *Geoderma* 314:122–137

- Rico D, Martin-Diana AB, Barat JM, Barry-Ryan C (2007) Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends Food Sci Technol* 18:373–386
- Rosa SM, Kraemer FB, Soria MA, et al (2014) The influence of soil properties on denitrifying bacterial communities and denitrification potential in no-till production farms under contrasting management in the Argentinean Pampas. *Appl Soil Ecol* 75:172–180
- Schreiter S, Ding G-C, Heuer H, et al (2014) Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol* 5:144
- Shoun H, Kim D-H, Uchiyama H, Sugiyama J (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett* 94:277–281
- Smith KA (1990) Anaerobic zones and denitrification in soil: modelling and measurement. In: *Denitrification in soil and sediment*. Springer, pp 229–244
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, et al (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671
- Urlić B, Jukić Špika M, Becker C, et al (2017) Effect of NO₃ and NH₄ concentrations in nutrient solution on yield and nitrate concentration in seasonally grown leaf lettuce. *Acta Agric Scand Sect B—Soil Plant Sci* 67:748–757
- Wallenstein MD, Myrold DD, Firestone M, Voytek M (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecol Appl* 16:2143–2152
- Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K (2009) Temporal shifts in diversity and quantity of nirS and nirK in a rice paddy field soil. *Soil Biol Biochem* 41:2044–2051

CHAPITRE 4.

**L'inhibition biologique de dénitrification (BDI)
appliquée au champ induit-elle une augmentation de
la croissance et de la nutrition d'une espèce végétale à
croissance longue : *Apium graveolens* L. ?**



Figure 23 : Photographie des parcelles de la troisième expérimentation à la station expérimentale la SERAIL à Brindas sur des cultures de céleri. Expérimentation où une à deux fréquences d'apports de procyanidines et d'engrais azotés ont été appliqués sur une culture de céleri branche.

Il a été démontré lors des deux précédents chapitres que la laitue répond positivement à un BDI induit par une application de procyanidines par pulvérisation, et ce d'une année sur l'autre et sur deux types de sols différents. La laitue est une espèce végétale dont la culture ne représente que quelques semaines (environ 6) et ne demandant qu'un seul important apport d'engrais (Ekengard, 2008). Nous avons donc voulu tester ici **l'effet des procyanidines en champ et du BDI sur un autre type de culture plus consommatrice d'azote et dont la culture est plus longue**. Pour ce faire, nous avons testé le céleri branche (*Apium graveolens* L.) qui est une plante demandant deux apports importants d'engrais azotés, nécessitant une culture d'environ 3 mois (Charles et al., 2006) et pouvant accumuler une forte concentration de nitrate dans ses tissus (Anjana and Iqbal, 2007; Santamaria, 2006).

Il a donc été testé à la station expérimentale de la Serail une culture de céleri avec des parcelles cultivées de façon conventionnelle avec deux apports d'engrais azotés ainsi que des parcelles n'ayant été amendées qu'avec la première application d'engrais. En parallèle, des parcelles ont reçu des apports de procyanidines commerciales par pulvérisation à 210 kg.ha⁻¹ une ou deux fois au même moment que les apports d'engrais.

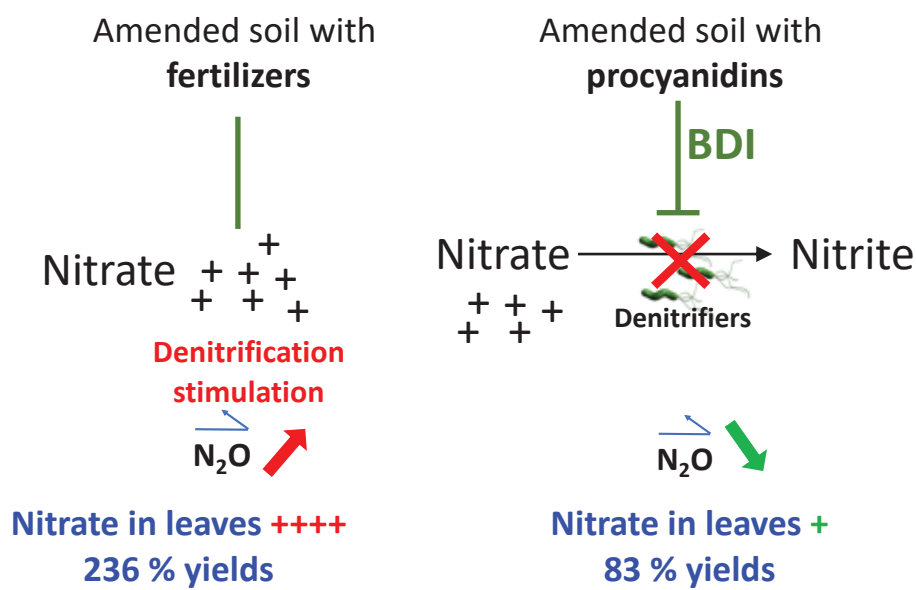
Différentes analyses ont été réalisées pour répondre à notre objectif : la concentration en nitrates dans les sols a été mesurée dans toutes les parcelles avant l'apport en procyanidines et le jour de la récolte, par chromatographie ionique. L'activité de dénitrification et

l'abondance des bactéries dénitrifiantes et des communautés bactériennes totales ont été mesurées à partir des sols de chaque parcelle prélevés le jour de la récolte à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse et de qPCR, respectivement. En outre, les traits morphologiques des céleris ont été quantifiés en mesurant la hauteur des plants, la masse fraîche des parties aériennes et des racines ainsi que la teneur en azote des tissus. Des mesures de pigments des feuilles ont été réalisées afin de déterminer le niveau de stress azoté des plantes suite aux différents apports.

Il a été montré ici que l'ajout de procyanidines induit un BDI qui augmente le niveau de nitrate dans le sol induisant une augmentation des traits morphologiques des céleris. Notre étude montre également que, bien que les traitements conventionnels aux engrais génèrent une plus grande productivité, l'amendement en procyanidines induit une plus faible concentration d'azote dans les tissus et réduit les émissions de gaz à effet de serre (N_2O) par comparaison aux traitements engrais conventionnels.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article dans la version soumise au **journal Current Research in Biotechnology**.

Celery crops



Highlights

- Exogenously applied procyanidins in the field increases celery crop yields
- Procyanidins amended in soil with celery induce BDI.
- Celery amended with procyanidins has less nitrate in its tissues
- Denitrification activity and denitrifying bacteria are stimulated by fertilisation

Does biological denitrification inhibition (BDI) in the field induce an increase in plant growth and nutrition for the plant species *Apium graveolens* L. grown for a long period?

William Galland^{1,2}, Florence Piola², Céline Mathieu³, Lyna Bouladra¹, Laurent Simon² and Feth el Zahar Haichar^{1*}.

¹Université de Lyon, UMR 5557 LEM, Université Lyon 1, CNRS, INRA 1418, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

²Université de Lyon, UMR5023 LEHNA, Université Lyon 1, CNRS, ENTPE, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

³Station d'Expérimentation Rhône-Alpes Information Légumes (SERAIL), 123 chemin du Finday Les Hoteaux – 69126 Brindas, France.

*Corresponding author: Feth el Zahar Haichar, zahar.haichar@univ-lyon1.fr

Keywords: Biological Denitrification Inhibition (BDI), celery, fertilizers, procyanidins, nitrogen, denitrification, plant growth, traits.

ABSTRACT

Intensive agriculture uses a significant amount of nitrogen fertilizer to improve the productivity of crops that require nitrogen, one of the most important and limiting factors of plant growth. Modern agriculture encompasses a wide variety of crop types, each with

different nutrient requirements. These crops are in competition with denitrifying microorganisms that assimilate nitrogen in the form of nitrate in the soil and transform it into N_2O , a greenhouse gas, or N_2 . However, certain plant species exude secondary metabolites (procyanidins) that inhibit denitrifying bacteria and hence increase the pool of nitrate in the soil, which becomes available for plant nutrition and growth. This phenomenon is called biological denitrification inhibition (BDI). Our previous studies have shown that the addition of exogenous procyanidins to a lettuce crop increases the BDI and nitrate content in the soil and affects lettuce morphological traits. In this study, we wanted to test the effects of procyanidin amendments in the field on a more long-term and nitrogen-consuming crop species such as celery. We therefore compared the effects of procyanidin amendment on celery growth with those of conventional ammonium nitrate amendments in the field. We measured the denitrification activity, the nitrate concentration and the abundance of denitrifying bacteria in the soil. With respect to the celery plants, we measured their height, shoot and root mass, and chlorophyll and nitrogen levels. We showed that the addition of procyanidins increases the BDI, which in turn increases the nitrate level in the soil, inducing an improvement in morphological traits. The results of our study also show that, although conventional fertilizer treatments result in higher productivity, procyanidin treatments induce a lower nitrogen concentration in tissues and reduce greenhouse gas emissions (those of N_2O) compared to fertilizer treatments.

1. INTRODUCTION

In France, agricultural crops are very numerous and diversified [1] and there are several types of crops such as field crops [2,3], vegetable crops [4] and those involving arboriculture [5]. The plants of these crops do not present the same biological cycle and therefore have the same

nutrient requirements [6,7]. The current state of agriculture involves pushing for a significant increase in yields to meet increased consumer demand [8,9] and the demographic development of human populations on Earth [10].

Plants need nitrogen, which is one of the most important but also the most limiting factors for plant growth [11]. Plants assimilate nitrogen mainly in the form of ammonium (NH_4^+) but also as nitrate (NO_3^-) [12]. However, intensive agriculture requires the use of soils that may lack nutrients because of nitrogen depletion due to many successive crops [13,14] and direct competition with soil microorganisms for nitrate [15]. Among these microorganisms, archaea [16], fungi [17], and especially bacteria [18] will transform NO_3^- into N_2 and N_2O , the latter being a greenhouse gas, by denitrification processes [19]. Denitrification can result in a loss of up to 59% nitrogen in agricultural systems [20]. In addition, nitrate can also leach out of the soil [21] and potentially cause pollution or even human health problems [22].

To enhance crop yields, farmers amend soils with nutrients such as nitrogen fertilizers [23]. However, when applied, nitrogen fertilizers are not totally allocated to plants; these inputs are lost by different mechanisms, as mentioned above [24].

Nevertheless, under natural conditions, certain plant species, such as the invasive plant (*Fallopia* spp.), exude secondary metabolites called procyanidins that inhibit microbial denitrification activity, a phenomenon called biological denitrification inhibition (BDI) [25]. This phenomenon allows plants to limit the nitrate consumption of denitrifiers and hence allows plants to use the nitrate for their own nutrition and growth. Recently, Galland et al. [26] demonstrated that an exogenous supply of procyanidins in a field experiment involving lettuce crops induced BDI, which resulted in (i) a decrease in denitrification activity, (ii) an increase in nitrate concentration in plant tissues and (iii) a significant increase in lettuce mass. Moreover, lettuce (*Lactuca sativa*) tested by Galland et al. [26] is a crop that lasts only a few

weeks and requires only one application of fertilizers [27] to allow the crop to reach term at acceptable and marketable yields. Other plants species such as celery (*Apium graveolens* L.) have a longer growing cycle than lettuce and require more nitrogen for their growth. In this case, farmers apply two important fertilizer inputs during cultivation [28]. In addition, celery can accumulate high nitrate concentrations in its tissues, and thus, a soil highly amended with nitrogen fertilizers could increase the concentration of nitrate within celery, causing health problems for the consumers [29,30].

In this study, we aimed to test whether procyanidin amendment in a celery crop field experiment could provide nitrate requirements for such a crop and reduce the use of fertilizer. To do so, we performed tests on an experimental field at the SERAIL experimental station (Brindas, 69126 Rhône, France) plots planted with celery and amended with only one application of fertilizers or with the two conventional applications of fertilizers. Commercial procyanidins were amended at the same time as the fertilizer amendments, i.e., one time, or two times on others planted plots. Procyanidin concentrations were selected from the most effective concentration evidenced by Galland et al. [26] which was approximately 210 kg ha⁻¹ of procyanidins. Different analyses were performed to reach our objective: nitrate concentrations in the soil were measured in all plots before procyanidin amendment and on the day of harvest using ion chromatography. Denitrification activity and the abundance of both denitrifiers and total bacterial communities were measured in the soil of each plot collected on the day of harvest using gas chromatography and quantitative polymerase chain reaction approaches, respectively. In addition, celery plant traits such as leaf pigments, plant height, and fresh mass of the shoots and roots were quantified, and nitrogen contents in tissues were measured from celery from all plots.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant growth and experimental design

Celery (*Apium graveolens* L. var TANGO, Bejo) was grown on one field at the SERAIL experimental station (Brindas, 69126 Rhône, France) (45°43'46.4 "N 4°43'37.1 "E) composed of a sandy clay loam soil (Sand: 68.7%, Silt: 21.9% and Clay: 9.5% CEC: 58 meq kg⁻¹; organic carbon: 6.9 g kg⁻¹). The celery was planted in 4 parallel rows of 20 celery on 6 m x 1.4 m (8.4 m²) plots, with an unplanted continuity of 2 m x 1.4 m (2.8 m²) to measure the corresponding unplanted characteristics, with three repetitions of plots per treatment. For soils planted with celery and the continuity of unplanted plots, 5 treatments were considered: unamended (0), amended once (1P) and amended twice (2P) with procyanidins and amended once with fertilizer (1F) and amended two times with fertilizer (2F). Celery was planted in the first week of June 2018. The first amended of procyanidins at 210 kg ha⁻¹ was done on the 8th week of culture and on the same time the ammo-nitrate fertilizers were applied to adjust each plot to a concentration about 100 kg of N ha⁻¹. The 2P plots received a supply of 210 kg ha⁻¹ of procyanidins on the 11th week of culture and on the same time the 2F plots received the second fertilizers amendment of about 60 kg.N ha⁻¹ of ammo-nitrate. The experiment was watered the first week after planting with 3 mm of water every day. For the next 10 days, 8 mm of watering was done per day. From that and until the end of the experiment, 12 mm of watering was done every two days. The commercial procyanidins (Laffort TANIN VR GRAPE[®]112, Bordeaux, France) were applied in aqueous solution (standard water) by 2 nozzle spray booms, such as to give 500 L ha⁻¹ or 0.42 L per plot, between the rows of celery, and the soil was then hoed. Each site was hoed and was watered (with 8 mm) just after the addition of procyanidins. The experiment was collected after 19 weeks of growth.

2.2. Denitrification Enzyme Activity (DEA)

As described by [Galland et al. \[26\]](#), denitrification enzyme activity (DEA) was measured from 5 g dry equivalent of pooled root-adhering soil (RAS) retrieved from 4 celery per plot and from 4 samples of bulk soil of unplanted plots amended or unamended with procyanidins or fertilizers. BDI (%) was measured by calculating the percentage of denitrification activity inhibition recorded by DEA compared to the corresponding unamended control.

2.3. Quantification of total bacteria and denitrifier abundance

Total DNA was extracted from 0.5 g RAS for six treatments (unplanted soil, RAS from unamended celery, celery with one and two fertilizers amendments and celery with one and two procyanidins amendments), in triplicate, according to the manufacturer's protocol of the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Solon, OH, USA). The amount of DNA extracted was then estimated using the Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay kit (Molecular Probes, USA). Total bacteria and denitrifier abundances were quantified by quantitative PCR using primers targeting the 16S rRNA and *nirK/nirS* genes respectively, as described previously by [Galland et al. \[26\]](#).

2.4. Nitrate concentrations in soil

Briefly, for all plots, NO_3^- was extracted one week before procyanidin/fertilizer application and on the day of harvest from the planted rhizospheric soils (20 cm from the base of 4 celery per plot and pooled) and from the unplanted soils. Nitrate was extracted from 5 g eq. of dried soil according to [Galland et al. \[26\]](#).

2.5. Measurement of celery traits

After 19 weeks of culture, for out of 10 celery per plot (30 per treatment) the height of the celery was measured using a ruler and the shoots were then harvested and weighed on a balance (± 0.5 g). In addition, 4 root systems per plot (12 per treatment) were harvested, washed using distilled water and weighed on a precision balance (± 0.001 g), dried at 68°C for 24 h and weighed again on the same balance in order to determine dry masses.

2.6. Plant N content

As described in [Galland et al. \[26\]](#), total N concentration was measured using an elemental analyser (FlashEA 1112, Thermo Scientific, Waltham, USA) from 3 leaves and 3 root systems per plot (9 per treatment), using 2 mg of ground root or leaf material. Leaf and root N content was expressed in percentage of N in leaf and root dry mass.

2.7. Colorimetric measurement of nitrogen stress

Using the device Dualex™ (FORCE-A, Orsay, France), the chlorophyll surface contents (expressed in dualex units, relative unit of the manufacturer) and the nitrogen status NBI (Nitrogen Balance Index, being the ratio of measured Chlorophyll/Anthocyan values) were measured on the last third leaf of 10 celery per plot (30 per treatment).

2.8. Data and statistical analyses

The difference on celery morphological traits ($n \geq 30$) between treatments was determined using an ANOVA (analysis of variance) followed by a post-hoc Tukey HSD test. Similarly, the normality (Shapiro test) and the homoscedasticity of variance (Fischer test) of all the variables were tested. The significance of microbiological traits and nitrate concentration ($n \leq 4$) between treatments was non-parametrically tested with Kruskal Wallis's test followed by a

post-hoc Nemenyi. In addition, the plot effect was tested and discarded on all traits (two-way ANOVA and mixed model). All the analyses were done using R project software (v. 3.5.0).

3. RESULTS

3.1. Biological denitrification inhibition

As shown in Figure 1, the BDI of soils amended with fertilizer once (1F) and twice (2F) was not significantly different from that of unamended soils (0). However, a tendency for denitrification stimulation was observed for the 1F and 2F plots. Although there was a BDI of approximately 8.6% for soils amended with a single procyanidin application, the value was not significantly different from that of unamended soils or soils amended with one or two fertilizer applications. Notably, the addition of two doses of procyanidins induced a BDI of approximately 19 %, which was significantly different from that of the unamended soils (p-value: 0.023) and the soils amended with one (p-value: 0.019) or two (p-value: 0.017) fertilizer applications but was not significantly different from that of the soils amended with a single procyanidin application.

For the planted soil (Fig. 1), the BDI was the same between the soils fertilized with one or two applications and the unamended plants. However, the BDI of the planted soil amended with procyanidins was significantly different (p-value: 0.048 for 1P and 0.025 for 2P) from that of unamended plants and fertilized plants once (p-value: 0.049 for 1P and 0.035 for 2P) and twice (p-value: 0.049 for 1P and 0.028 for 2P).

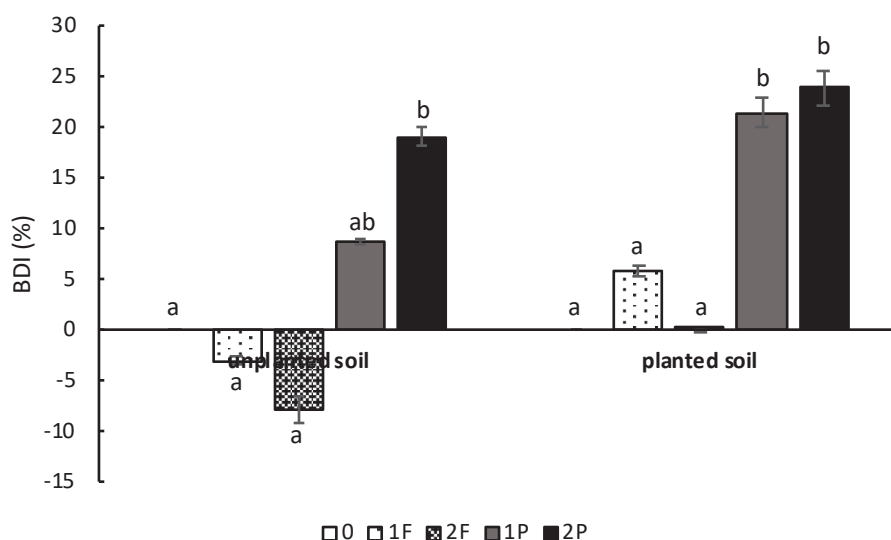


Figure 1: Impact of different field amendments on the percentage of Biological Denitrification Inhibition (BDI).

Unamended (0), one fertilizers application (1F), two fertilizers applications (2F), one procyanidins application (1P) and two procyanidins applications (2P). BDI (%) was calculated in relation to unamended soil for soil treatments and unamended plants for plant treatments. $n=4$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Differences in letters indicate a difference in treatment (Nemenyi's test; $\alpha<0.05$).

3.2. Abundance of total and denitrifying bacterial communities

The abundance of the total bacterial community did not differ between unplanted soil, unamended celery and celery amended with procyanidins (1P and 2P) (Fig. 2A). However, the abundance was significantly higher for celery amended once (p-value: 0.014) and twice (p-value: 0.003) with fertilizer compared to unplanted soils, unamended celery (p-value: 0.006 for 1F and 0.0001 for 2F) and celery amended with procyanidins once (p-value: 0.008 for 1F and 0.0008 for 2F) and twice (p-value: 0.022 for 1F and 0.009 for 2F). The abundance of the *nirK* gene was not significantly different between unplanted and planted soils, with the exception of celery amended twice with fertilizer, whose abundance of the bacterial community harbouring *nirK* was significantly greater (p-value: 0.004) than that of the other treatments (Fig. 2B). Similarly, the abundance of the *nirS* gene was not different between

unplanted and planted soils, with the exception of celery amended twice with fertilizer, whose abundance of the bacterial community harbouring *nirS* was significantly greater (p-value: 0.004) than that of the other treatments (Fig. 2C). Interestingly, compared with unamended celery and celery amended twice with fertilizer, procyanidin applications tended to decrease the abundance of *nirS*. This trend was even more pronounced when procyanidins were applied twice.

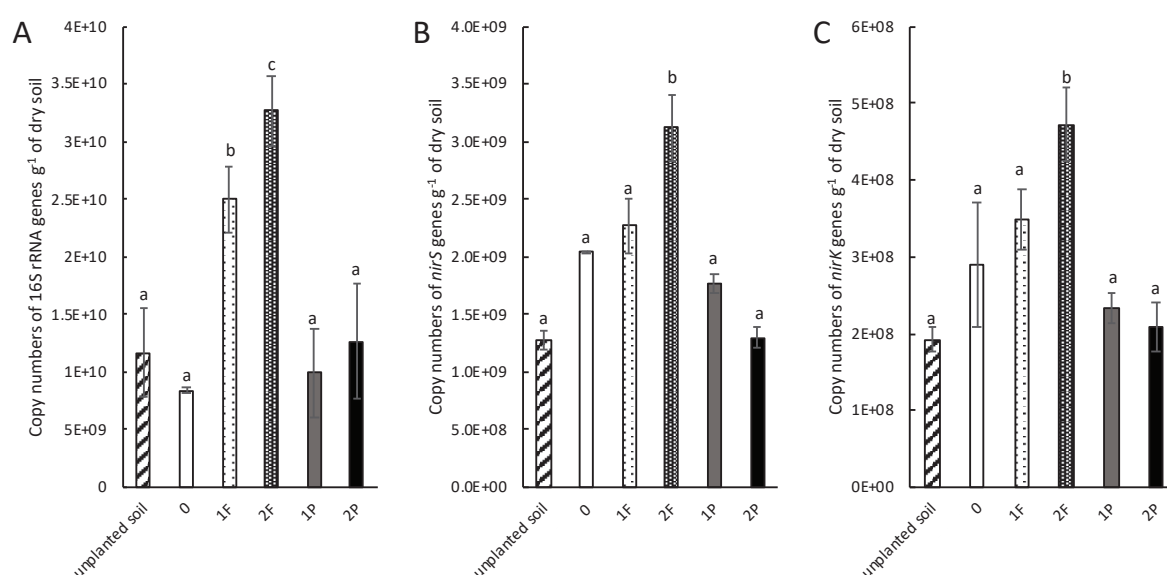


Figure 2: Amendment effects on total and denitrifying bacterial abundance. Unplanted soil, unamended (0), one fertilizers application (1F), two fertilizers applications (2F), one procyanidins application (1P) and two procyanidins applications (2P). **(A)** Total bacterial community (copy numbers of 16S rRNA.g⁻¹ of dry soil), **(B)** Denitrifying bacteria with copy numbers of *nirK* g⁻¹ of dry soil, and **(C)** denitrifying bacteria with copy numbers of *nirS* g⁻¹ of dry soil. n = 3 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Different in letters indicate which means differed (Nemenyi's test, $\alpha < 0.05$).

3.3. Effects of amendments on soil nitrate content

One week before procyanidin application (T0) (Fig. 3A), the nitrate level was the same

between the unplanted soil treatments and between the celery treatments. However, significantly lower levels of nitrate were detected in the celery treatments compared to the unplanted soil treatments (p-value: 0.02). At harvest (TF), nitrate concentrations measured in unplanted soils amended twice with procyanidin differed significantly (p-value: 0.01) from those in the other treatments, except for soils amended once with procyanidin (Fig. 3B). No significant differences were detected between the celery treatments (Fig. 3B).

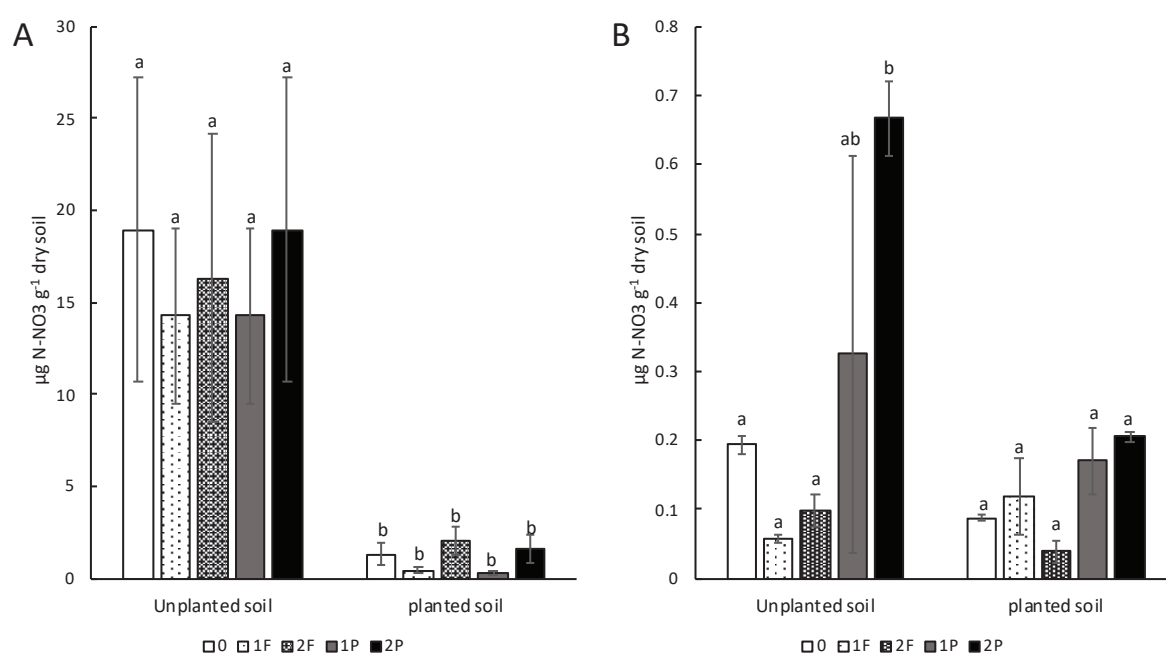


Figure 3: Effects of different types of amendments with procyanidins or fertilizers on soil nitrate level of unplanted soils and planted soils with celery. Unamended (0), one fertilizer application (1F), two fertilizer applications (2F), one procyanidin application (1P) and two procyanidin applications (2P). **(A)** for T0 before procyanidins or fertilizers amendments and **(B)** for TF corresponding to the day of harvest. n = 4 for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Differences in letters indicate a difference in treatment (Nemenyi's test; $\alpha < 0.05$).

3.4. Effect of amendments on celery traits

To test the effects of procyanidin (1P and 2P) and fertilizer (1F and 2F) amendments on celery traits, the shoot and root fresh mass and plant height were measured (Fig. 4). The shoot fresh mass of celery grown on soils amended once with procyanidins was on average approximately 391.1 g, which is approximately 126 g (or 47 %) more than that of unamended celery (p-value: 0.053) although the results were not significantly different (Fig. 4A). Similarly, celery amended twice with procyanidins had a shoot fresh mass of 487.4 g, representing a significant increase of approximately 222 g (83%) compared to that of unamended celery (p-value: 3.3×10^{-5}). Celery amended twice with procyanidins tended to present a shoot mass that was approximately 91 g (24%) greater than that of the celery amended only once, although the results were not significant. In addition, celery grown on soils amended once with fertilizer presented a shoot mass of approximately 758.6 g, which was significantly higher by approximately 493.3 g (or 186%), 367.5 g (or 94%) and 271.2 g (or 55%) than that of the unamended celery (p-value: 7.4×10^{-6}), celery amended once with procyanidins (p-value : 2×10^{-7}) and celery amended twice (p-value : 2×10^{-7}) with procyanidins, respectively. Celery grown on plots with the conventional fertilizer amendment (2F) had an average shoot mass of approximately 890.9 g, which was significantly greater by 625.5 g (or 236%), 132.3 g (or 17%) and 403.5 g (or 82%), on average than that of unamended celery (p-value: 4×10^{-7}), celery amended once with fertilizers (p-value : 0.036) and celery amended two times with procyanidins (p-value : 5×10^{-7}), respectively (Fig. 4A).

The fresh mass of the root system of celery amended twice with procyanidins was approximately 186.6 g, which was significantly higher by 60.2 g (or 47%) (p-value: 0.024) than that of unamended celery (Fig. 4B). It is interesting to note that, although not significant, the

fresh root masses of celery amended with procyanidins tended to be 39 g higher on average than the fresh mass of celery amended with fertilizer.

Celery amended once with procyanidins had an average height of 36.9 cm, which was significantly higher by 10.2 cm on average (or 37%) than that of the unamended celery, which was approximately 26.8 cm in height (p-value: $1.33\text{e-}6$). The height of celery amended once with procyanidins was statistically no different from that of celery amended twice. The height of celery treated with two procyanidin amendments was significantly higher by an average of 13.8 cm (or 52%) than that of the unamended celery (p-value: $4\text{e-}8$). In addition, celery amended once or twice with fertilizer presented a significant increase in height of approximately 22 cm for 1F (or 82%) (p-value: $8\text{e-}8$) and 22.6 cm for 2F (or 85%) (p-value: $8\text{e-}8$) that of unamended celery. Notably, the height of celery amended once or twice with fertilizers was significantly higher than that of celery amended once or twice with procyanidins (p-value: $1\text{e-}5$) (Fig. 4C).

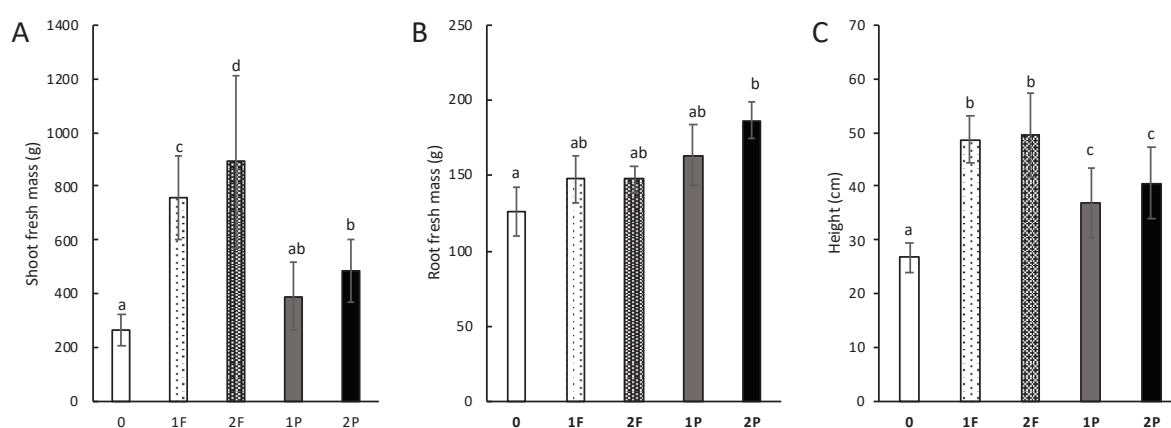


Figure 4: Impact of different field amendments on celery morphological traits. Unamended (0), one fertilizer application (1F), two fertilizer applications (2F), one procyanidin application (1P) and two procyanidin applications (2P). **(A)** the fresh mass of the celery aerial parts (g), **(B)** the fresh mass of the celery root systems (g) and **(C)** the height of the celery aerial parts (cm). $n = 30$ for aerial part and $n=6$ for roots. Vertical bars indicate standard errors. Differences in letters indicate a difference in treatment (Tukey's test for shoot fresh mass and height, Nemenyi's test for root fresh mass, $\alpha < 0.05$).

3.5. Effect of amendments on plant N content

The percentage of nitrogen content in the shoots of unamended celery was, on average, approximately 1.3%. The N content was not affected by one procyanidin application, as we obtained the same level as that in the unamended celery. In addition, although the N content of the shoots of celery amended twice with procyanidins was on average approximately 1.4%, this result is not significantly different from the N content of the shoots of either celery amended once with procyanidins or unamended celery (Fig. 5A). However, the percentage of N in the leaves of celery amended once with fertilizer was approximately 2.66%, which was significantly higher than the N content of the shoots of unamended celery (p-value: 0.024) and the shoots of celery amended once with procyanidins (p-value: 0.043). No significant difference was detected between the N percentage in the shoots of celery amended once with fertilizer and that of celery amended twice with procyanidins. In addition, the N percentage of shoots of celery amended twice with fertilizer was approximately 3.7%, but this percentage did not differ significantly from that of celery amended with a single fertilizer application. However, this N percentage was significantly higher than that of celery amended once with procyanidins (p-value: 0.04), celery amended twice with procyanidins (p-value: 0.02) and unamended celery (p-value: 0.04).

The N content in unamended celery roots was approximately 0.59% and did not differ significantly from the 0.39% and 0.59% N of celery amended once with procyanidins and that twice with procyanidins, respectively (Fig. 4B). However, the N content in the roots of celery amended once with fertilizers was approximately 0.99%. This value, although high, did not significantly differ from the N concentration in the roots of unamended celery and in those of celery amended twice with procyanidins. Similarly, the N concentration in the roots of celery

amended twice with fertilizer was approximately 1.4% and tended to be higher than that of celery amended once with fertilizer, albeit not significantly. This concentration was significantly higher than that of unamended celery (p-value: 0.04) celery amended once with procyanidins (p-value: 0.01) and celery amended twice with procyanidins (p-value: 0.04).

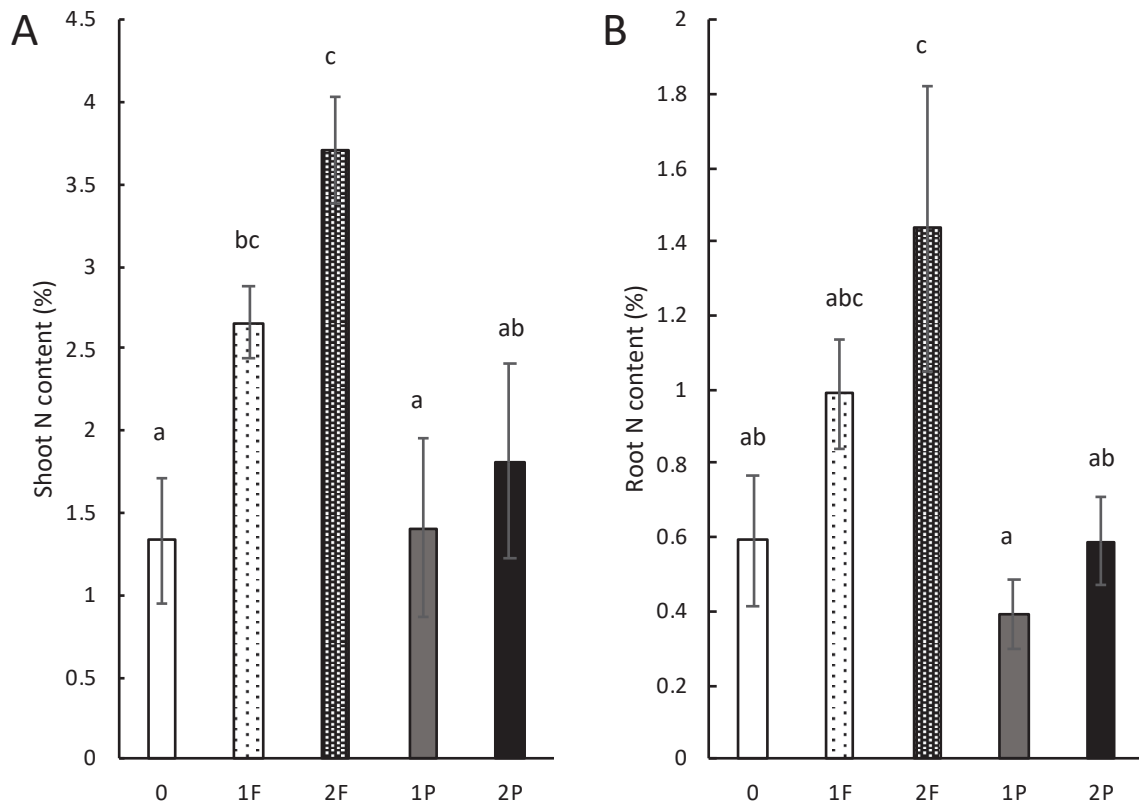


Figure 5: Amendment effects on shoot and root N content. Unamended (0), one fertilizer application (1F), two fertilizer applications (2F), one procyanidin application (1P) and two procyanidin applications (2P). **(A)** shoot and **(B)** root N content (% of dry mass). $n = 3$ for each treatment. Vertical bars indicate standard errors. Differences in letters indicate a difference in treatment (Nemenyi's test; $\alpha < 0.05$).

3.6. Effect of amendments in colorimetric measurements of N stress

The relative chlorophyll content of the leaves of unamended celery was 14.2 Dualex units and was significantly lower than the 23.8, 32.8, 35.1 and 44.3 Dualex units of the leaves of celery amended once with procyanidins (p-value: $4e-6$), twice with procyanidins (p-value: $1e-7$), once

with fertilizers (p-value: $8e-8$) and twice with fertilizers (p-value: $3e-9$), respectively (Fig. 6A). The leaves of celery amended once with procyanidins presented a relative chlorophyll content that was significantly lower than that presented by the leaves of celery amended twice with procyanidins (p-value: $7e-5$), once with fertilizers (p-value: $3e-6$), and twice with fertilizers (p-value: $5e-6$). The chlorophyll content of the leaves of celery amended twice with procyanidins did not differ from that of the leaves of celery amended once with fertilizer but was significantly lower than that of the leaves of celery amended twice with fertilizer (value p: $6e-7$). The chlorophyll content of the leaves of celery amended once with fertilizer was significantly lower than that of the leaves of celery amended twice with fertilizer (p-value: $5e-6$).

The nitrogen balance index (NBI) measured in the leaves of unamended celery was significantly lower than that of celery amended once with procyanidins (p-value: 0.03), twice with procyanidins (p-value: $5e-7$), and once (p-value: $7e-7$) or twice (p-value: $8e-7$) with fertilizer (Fig. 6C). Notably, the NBI measured on the leaves of celery amended once with procyanidins was significantly lower than that of the leaves of celery amended twice with procyanidins (p-value: 0.003), and once (p-value: $2e-6$) or twice (p-value: $4e-6$) with fertilizer. The NBI measured in the leaves of celery amended twice with procyanidins did not differ from that of celery amended once with fertilizer but was significantly lower than the NBI of leaves of celery amended twice with fertilizer (p-value: $4e-6$).

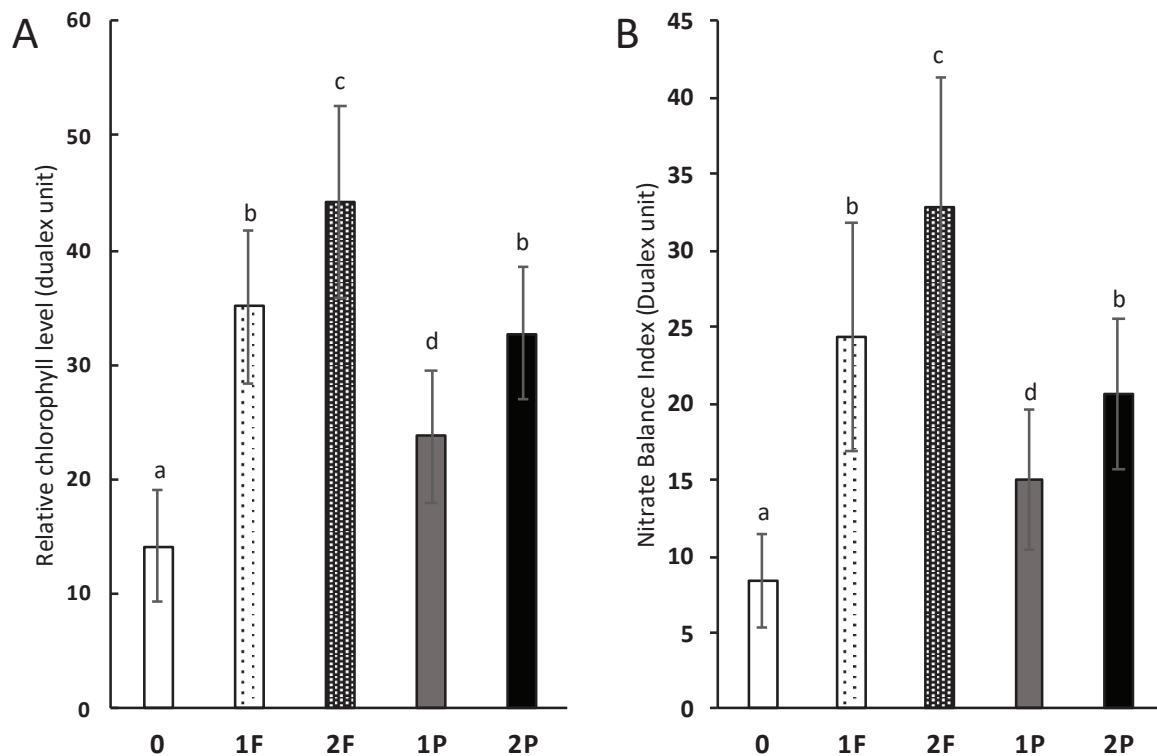


Figure 6: Impact of different field amendments on the pigment level of celery leaves. Unamended (0), one fertilizer application (1F), two fertilizer applications (2P), one procyanidin application (1P) and two procyanidin applications (2P). **(A)** relative chlorophyll level (Dualux unit) and **(B)** Nitrate Balance Index (Dualux unit) of the last third celery leaf. $n = 30$. Differences in letters indicate a difference in treatment (Tukey's test; $\alpha < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Procyanidin amendment to celery plots induced an increase in BDI

As in Galland et al. [26], the addition of procyanidins at 210 kg ha^{-1} in the field induced a BDI that was at the root adhering-soil level of celery plants. This BDI was more notable in unplanted and planted plots amended twice with procyanidins. Two procyanidin amendments may increase procyanidin bioavailability in the soil, consequently inducing an increased BDI. The BDI tended to be lower when measured on planted soils than on unplanted soils with equivalent treatments. This result suggests that the BDI is not stimulated by plants; in contrast, probably *via* their rhizosphere (root exudation, root respiration and nitrate

availability), plants stimulate denitrification activity, as shown in [Guyonnet et al. \[31\]](#), thus decreasing the BDI. In addition, the BDI measured in soils planted with celery amended only one time with procyanidins and in unplanted soils tended to be lower than that in plots with celery amended twice with procyanidins, probably due to the resilience of denitrifiers in these plots or the improved bioavailability of procyanidins following two applications. In the plots amended only once with procyanidins, there were approximately 76 days between the last procyanidin amendment and the BDI measurements, while in plots amended twice with procyanidins, there were only 55 days between the last amendment and the BDI measurements. It seems that the longer the time between the moment of procyanidin application and BDI measurement is, the lower the BDI. This result suggests that the effect of procyanidins on denitrifier activity decreases in a relatively short period of time, as described by [Zerulla et al. \[32\]](#), who showed that the level of nitrification activity of soil bacterial communities returned to the initial nitrification activity level at 4 to 10 weeks after the addition of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), a nitrification inhibitor, to the soil.

As shown in [Galland et al. \[26\]](#), the procyanidin amendment did not affect the abundance of the total bacterial community and reduced only the abundance of denitrifiers which seems to be counter-selected by plants as they lost their function. Moreover, the abundance of denitrifying bacterial communities tended to be relatively low when there were two procyanidin applications rather than one, supporting the hypothesis suggested above that this is either an effect related to the increased bioavailability of procyanidins following two applications or a trend towards the resilience of denitrifying bacterial communities when procyanidins were applied once.

Planted soil fertilized once or twice with ammonium nitrate induced denitrification activity in the soil adhering to the roots. This result is consistent with a previous study by

Mulvaney et al. [13] who explained that nitrogen fertilizer promotes the denitrification process. Similarly, the abundance of denitrifying communities seems to be stimulated by fertilization. Once again, this finding was in agreement with a study by Sun et al., [33] demonstrating that nitrogen fertilizer induces an increase in the abundance of communities involved in the nitrogen cycle, including those of denitrifiers. In addition, nitrogen fertilizer amendment induced an increase in the abundance of the total bacterial community, as shown in Lavenhar et al. [34]. Moreover, the addition of fertilizer resulted in an increase in the nitrate pool in the soil, stimulating denitrification activity and inducing both high N₂O emissions and nitrate loss from the soil, as also observed in Venterea et al. [35].

4.2. The addition of procyanidins to the plots induced an improvement in celery morphological traits

Soil nitrate pool was increased in unplanted soil amended once and twice with procyanidins as observed by Bardon et al. [36]. No conservation of nitrate was observed in the planted soils, as celery plants consumed nitrate for their growth [37] which explains the lower nitrate concentrations in the planted treatments compared to those under the unplanted conditions. Interestingly, the nitrate concentrations in the unplanted and planted soils amended once or twice with fertilizer were lower than those in soils with celery amended with procyanidins. This finding could be explained by denitrifier activity, which was more important in the fertilized plots than in the plots with celery amended with procyanidins where denitrification activity was inhibited, allowing relatively more nitrate in those plots. Therefore, in these planted plots, as observed for lettuce plants [26], the addition of procyanidins increased the fresh mass of the shoots and roots as well the height of the celery plants, and this tended to increase when the celery was amended twice with procyanidins, suggesting that this

treatment made nitrate more available and for a relatively long period than did the single amendment.

Compared to the shoots of unamended celery plants, there were gains of approximately 47% and 53% in the shoots of plants amended once or twice with procyanidins, respectively. These gains were very low compared with those of conventional celery amended twice with fertilizer (236%) and celery amended once with fertilizer (186%). Thus, treatment with fertilizer seems to be relatively effective but could lead to increased levels of nitrate in the soil, which can be leached or consumed by denitrifiers, generating increased amounts of N₂O emissions into the atmosphere. Thus, to potentially make more nitrate available to plants, it might be possible to increase the percentage of BDI by adding a third application of procyanidins to crops. This application would further inhibit the denitrifying microbial community, increasing the amount of nitrate available for plants and bringing their yields closer to conventional yields without releasing nitrate into agrosystems, which can negatively impact the environment.

In addition, as observed with lettuce in [Galland et al. \[26\]](#), where lettuce amended with procyanidins developed more roots than shoots, celery amended with procyanidins also developed more root than shoots when amended with procyanidins than when amended with fertilizer. As the denitrifier distribution in the soil is heterogeneous, nitrates available to plants due to denitrifier inhibition also would be heterogeneously spatially distributed in the soil. To benefit from this nitrate, plants allocate new and increased amounts of root growth in the nitrate-containing zone, which could explain the gain in root mass, as previously demonstrated for young lettuce plants subjected to a heterogeneous spatial distribution of nitrate in the root zone [\[38\]](#).

In addition, N levels in the shoot and root tissues did not differ between unamended celery and celery amended once or twice with procyanidins and were lower than those obtained

from celery amended once or twice with fertilizer, confirming the results of the [Van Wassenhove et al. \[39\]](#) study, which showed that the application of nitrogen fertilizer to a celery crop increases the nitrate concentration in the leaves. Thus, the nitrate available following the addition of procyanidins is concentrated little in celery tissues, and the physiology of that celery did not differ from that of unamended celery. This relatively low nitrate concentration could mean a relatively risk for consumer health [\[29,30\]](#).

In the same way, the results of the colourimetry measurements made with the Dualex Force-A exhibit the same trends as those of the other measured features. According to [Cerovic et al. \[40\]](#) relative chlorophyll levels are relatively high when plants are not stressed by soil nitrogen levels, and the plants allocate relatively high amounts of resources to their primary metabolism. These values were lower in all plots than in those with conventionally amended celery. In addition, the NBI measured by this device, as described by [Jezek et al. \[41\]](#), provides information on the nitrogen status of the plant because a nitrogen-deficient plant will produce less chlorophyll and relatively more flavonoids than will a nitrogen-sufficient plant, which will produce the opposite. Thus, the NBI allows us to compare between treatments to obtain more specific data on nitrogen-related stress. The NBI was higher when celery was amended with procyanidins than when celery was not amended, which indicates less stress on the plant, but this stress related to soil nitrogen was higher than when celery was amended with fertilizer. However, it is interesting to note that the NBI measured in celery amended once with fertilizer was similar to that measured in celery amended twice with procyanidins, which means that plant nitrogen stress tended to decrease under the double procyanidin treatment. This stress may decrease further if a third application of procyanidins is applied to a crop, which could also decrease the NBI and increase the chlorophyll levels, tending to make them equal to the levels of conventional celery.

5. Conclusion

The addition of procyanidins to celery fields induced a BDI, increased the nitrate pool available in the soil and increased the morphological traits of celery compared to the unamended celery. These traits are less important than those obtained for celery amended with fertilizers in a conventional agriculture. However, N levels in the plant remain lower when celery was amended with procyanidins than fertilizers and potentially represents a less risk of nitrate contamination for the consumers. Although the masses of these celery amended with procyanidins are smaller than conventional celery, they are still large enough to be placed on the market. In order to be close to the masses of conventional celery without increasing N plant level, 3rd procyanidins amendment could be a good balance to induce more BDI and hence more nitrate available for plants growth. It would be interesting for the future to take into account the more organic nature of this type of amendment, which did not have a negative effect in the environment by emitting N₂O to the atmosphere as it is the case for conventional celery production.

Acknowledgements

This work was supported by Auvergne-Rhône-Alpes region (ARC 2016-2019) for thesis subvention. We knowledge funding from the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0005, DIORE). Quantitative PCR were performed at the DTAMB platform (FR BioEnviS, University Lyon1). Field experiments were performed at Serail station. Microbial activities were measured at the AME platform (UMR 5557) and C and N content were measured at

Isotope Ecology platform (UMR 5023). We thank Laurent Philippot and Delphine Moreau for scientific discussions.

References:

- [1] H.P.P. Donfouet, A. Barczak, C. Détang-Dessendre, E. Maigné, Crop production and crop diversity in France: a spatial analysis, *Ecological Economics*. 134 (2017) 29–39.
- [2] L. Borrás, G.A. Slafer, M.E. Otegui, Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal, *Field Crops Research*. 86 (2004) 131–146.
- [3] E.-C. Oerke, H.-W. Dehne, Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection, *Crop Protection*. 23 (2004) 275–285.
- [4] S.H. Wittwer, N. Castilla, Protected cultivation of horticultural crops worldwide, *HortTechnology*. 5 (1995) 6–23.
- [5] R.W. Harris, *Arboriculture: integrated management of landscape trees, shrubs, and vines.*, Prentice-Hall International, 1992.
- [6] K.G. Cassman, A. Dobermann, D.T. Walters, Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management, *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 31 (2002) 132–141.
- [7] A.D. Glass, Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption, *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22 (2003) 453–470.
- [8] S.L. Pollack, Consumer demand for fruit and vegetables: the US example, *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade*. 6 (2001) 49–54.
- [9] D. Tilman, K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor, S. Polasky, Agricultural sustainability and intensive production practices, *Nature*. 418 (2002) 671.
- [10] E. Boserup, *The conditions of agricultural growth: The economics of agrarian change under population pressure*, Routledge, 2017.
- [11] E. Ronen, Micro-elements in agriculture, *Practical Hydroponics and Greenhouses*. (2016) 35.
- [12] A.J. Bloom, The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources, *Current Opinion in Plant Biology*. 25 (2015) 10–16.
- [13] R.L. Mulvaney, S.A. Khan, T.R. Ellsworth, Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production, *Journal of Environmental Quality*. 38 (2009) 2295–2314.
- [14] K. Thorup-Kristensen, Root growth and soil nitrogen depletion by onion, lettuce, early cabbage and carrot, in: *International Conference on Environmental Problems Associated with Nitrogen Fertilisation of Field Grown Vegetable Crops* 563, 1999: pp. 201–206.
- [15] Y. Kuzyakov, X. Xu, Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance, *New Phytologist*. 198 (2013) 656–669.
- [16] H. Shoun, D.-H. Kim, H. Uchiyama, J. Sugiyama, Denitrification by fungi, *FEMS Microbiology Letters*. 94 (1992) 277–281.

- [17] L. Philippot, Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1577 (2002) 355–376.
- [18] C. Van der Salm, J. Dolfing, M. Heinen, G.L. Velthof, Estimation of nitrogen losses via denitrification from a heavy clay soil under grass, *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 119 (2007) 311–319.
- [19] M.M. Kuypers, H.K. Marchant, B. Kartal, The microbial nitrogen-cycling network, *Nature Reviews Microbiology*. 16 (2018) 263.
- [20] O. Oenema, H.P. Witzke, Z. Klimont, J.P. Lesschen, G.L. Velthof, Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27, *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 133 (2009) 280–288.
- [21] L.W. Canter, *Nitrates in groundwater*, Routledge, 2019.
- [22] Y. Zhai, X. Zhao, Y. Teng, X. Li, J. Zhang, J. Wu, R. Zuo, Groundwater nitrate pollution and human health risk assessment by using HHRA model in an agricultural area, NE China, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 137 (2017) 130–142.
- [23] T. De Ponti, B. Rijk, M.K. Van Ittersum, The crop yield gap between organic and conventional agriculture, *Agricultural Systems*. 108 (2012) 1–9.
- [24] R. Haynes, *Mineral nitrogen in the plant-soil system*, Elsevier, 2012.
- [25] C. Bardon, F. Piola, F. Bellvert, F. el Z. Haichar, G. Comte, G. Meiffren, T. Pommier, S. Puijalon, N. Tsafack, F. Poly, Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites, *New Phytologist*. 204 (2014) 620–630.
- [26] W. Galland, F. Piola, A. Burlet, C. Mathieu, M. Nardy, S. Poussineau, L. Blazère, J. Gervais, S. Puijalon, L. Simon, F. el Z. Haichar, Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: A strategy to improve plant nutrition and growth, *Soil Biology and Biochemistry*. 136 (2019) 107513. doi:10.1016/j.soilbio.2019.06.009.
- [27] K. Ekengard, Placed nitrogen (N) starter fertilizer for planted iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.), (2008).
- [28] K.S. Charles, M. Ngouajio, D.D. Warncke, K.L. Poff, M.K. Hausbeck, Integration of cover crops and fertilizer rates for weed management in celery, *Weed Science*. 54 (2006) 326–334.
- [29] S.U. Anjana, M. Iqbal, Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review, *Agronomy for Sustainable Development*. 27 (2007) 45–57.
- [30] P. Santamaria, Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (2006) 10–17.
- [31] J.P. Guyonnet, F. Vautrin, G. Meiffren, C. Labois, A.A. Cantarel, S. Michalet, G. Comte, F. el Z. Haichar, The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites, *FEMS Microbiology Ecology*. 93 (2017).
- [32] W. Zerulla, T. Barth, J. Dressel, K. Erhardt, K. Horschler von Locquenghien, G. Pasda, M. Rädle, A. Wissemeier, 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture, *Biology and Fertility of Soils*. 34 (2001) 79–84. doi:10.1007/s003740100380.
- [33] R. Sun, X. Guo, D. Wang, H. Chu, Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle, *Applied Soil Ecology*. 95 (2015) 171–178.

- [34] S. Lavenhar, A.Y. Kong, K. McGuire, D. Reid, The Effect of Varied Fertilizer Treatments on the Abundance of Total and Nitrogen-cycling Bacteria in Urban Rooftop Farming Systems, (2013).
- [35] R.T. Venterea, A.D. Halvorson, N. Kitchen, M.A. Liebig, M.A. Cavigelli, S.J.D. Grosso, P.P. Motavalli, K.A. Nelson, K.A. Spokas, B.P. Singh, Challenges and opportunities for mitigating nitrous oxide emissions from fertilized cropping systems, *Frontiers in Ecology and the Environment*. 10 (2012) 562–570.
- [36] C. Bardon, F. Poly, F. el Zahar Haichar, X. Le Roux, L. Simon, G. Meiffren, G. Comte, S. Rouifed, F. Piola, Biological denitrification inhibition (BDI) with procyanidins induces modification of root traits, growth and N status in *Fallopia x bohemica*, *Soil Biology and Biochemistry*. 107 (2017) 41–49.
- [37] P. Santamaria, A. Elia, F. Serio, M. Gonnella, A. Parente, Comparison between nitrate and ammonium nutrition in fennel, celery, and Swiss chard, *Journal of Plant Nutrition*. 22 (1999) 1091–1106.
- [38] I.G. Burns, Short-and long-term effects of a change in the spatial distribution of nitrate in the root zone on N uptake, growth and root development of young lettuce plants, *Plant, Cell & Environment*. 14 (1991) 21–33.
- [39] F.A. Van Wassenhove, P.J. Dirinck, N.M. Schamp, G.A. Vulsteke, Effect of nitrogen fertilizers on celery volatiles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38 (1990) 220–226.
- [40] Z.G. Cerovic, G. Masdoumier, N.B. Ghazlen, G. Latouche, A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids, *Physiologia Plantarum*. 146 (2012) 251–260.
- [41] M. Jezek, K.-H. Mühling, C.-M. Geilfus, Early-Stage Diagnosis of Nutrient Deficiency by Chlorophyll Fluorescence in Maize Leaves, *Magnesium Deficiency in Maize and Effectiveness of Nutrient Supply through MgSO₄ Leaf-Application*. (2016) 50.

DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

1. Application au champ des procyanidines, intérêts agricoles et économiques

Les résultats obtenus pendant ce doctorat nous ont montré que l'ajout de procyanidines en champs par pulvérisation au sol induit un BDI sur des cultures de laitue et céleri. Ce dernier permet d'augmenter le pool de nitrate disponible dans le sol ce qui, de ce fait, permet d'améliorer les traits morphologiques des cultures amendées. **Cet apport en sol de procyanidines peut représenter une alternative à l'utilisation excessive d'engrais.**

1.1 L'application de procyanidines en champs induit un BDI augmentant la productivité végétale

Les BDI observés pour la plus forte concentration que nous avons utilisée lors de nos essais à savoir de 210 kg.ha⁻¹, pouvaient aller jusqu'à 32 %. Ce BDI a induit des augmentations de rendement allant jusqu'à 33 % pour la laitue et 84 % pour le céleri ([Tableau 1](#)).

Tableau 1 : Bref récapitulatif des % de BDI et de rendements observés avec la plus grande concentration utilisée (210 kg.ha⁻¹) lors des essais menés sur des cultures de laitue et de céleri.

	Laitue (2017/SERAIL)	Laitue (2018/SERAIL)	Laitue (2018/Manziat)	Celeri (2018/SERAIL)
BDI (%)	27%	32%	31%	21%
Rendement (%)	16%	25%	33%	84%
Rendement racinaire (%)	63%	0%	-2%	50%

Ainsi, bien que les % de BDI soient dans les mêmes ordres de grandeur entre nos différents essais, il n'induit pas une augmentation des rendements similaire entre espèces par rapport à un témoin non amendé.

Ainsi, il est probable que l'effet des procyanidines et par extension du BDI dépende de l'espèce et de la variété de la plante sur lequel il est appliqué, comme l'observent [Vernieri et al. \(2002\)](#) avec l'application d'un biostimulant n'ayant pas la même productivité sur la laitue que sur la tomate. Ou bien encore comme [Kopta et al. \(2018\)](#) qui n'observent pas les mêmes rendements d'un biostimulant à base d'algues sur différentes variétés de laitues. Bien que les procyanidines n'agissent pas sur les plantes directement, elles agissent sur les microorganismes dénitrifiants et la disponibilité du nitrate dans le sol. Et il est admis que les plantes n'ont pas toutes la même façon d'assimiler les nutriments du sol ([Hobbie, 1992](#)) ni la

même source préférentielle d'azote qui peut être davantage tournée vers l'ammonium que le nitrate et *vice-versa* (Hodge et al., 2000).

L'efficacité d'une application d'une molécule en champs peut être dépendante de la physiologie de la plante, de ses caractéristiques de culture et de son génotype (Rengel, 2001; Calvo et al., 2014; du Jardin, 2012), ce qui est probablement aussi le cas pour l'efficacité du BDI.

De plus, nous observons d'une année et d'un sol sur l'autre, que la productivité des laitues n'est pas la même. Il faut alors noter que de tels essais en champs sont dépendants des conditions environnementales comme la météo (Cammalleri et al., 2014), le type de sol (Chang, 2017) ou la composition du sol en communautés microbiennes. La météo peut différer au cours du temps et géographiquement, ayant probablement un effet sur les procyanidines pouvant alors être lessivées ou adsorbées plus facilement par le sol. Ce phénomène est observé entre autres dans les études de Landry et al. (2005) ou Jefimova et al. (2014) qui observent la dispersion et par conséquent une diminution de l'effet, respectivement du glyphosate et de molécules polycycliques en champs en fonction des conditions météorologiques. Il faut noter également que la productivité peut différer en fonction d'une différence de météo d'une année sur l'autre, ou d'une région à l'autre (Clark and Tilman, 2017). Il est aussi bien connu que certaines textures de sols sont plus propices à la culture d'une espèce que d'autres, comme par exemple un sol sableux plus propice à la culture de laitue grâce à une plus grande disponibilité de l'eau (Lea et Azevedo, 2006; Roberts, 2008). De plus, il faut noter que les bactéries dénitrifiantes peuvent différer selon le sol et ne pas avoir la même diversité et/ou abondance, ce qui peut modifier l'utilisation de l'azote et son devenir dans les sols (Cavigelli and Robertson, 2000). Dans le sol, la répartition des porosités peut modifier la teneur en eau et par conséquent la disponibilité en oxygène (Gliński et al., 2004), qui joue un rôle dans l'induction de la dénitrification, qui est un processus anaérobie (Kraft et al., 2011). Ainsi, les différences de textures et structures du sol et la composition de la communauté bactérienne du sol peuvent modifier la dénitrification et l'effet des procyanidines sur l'activité de dénitrification qui, comme les autres molécules organiques, présentent des comportements et affinités variables selon le sol avec lequel elles sont en contact (Lützow et al., 2006).

Malgré cela, nous avons observé dans le troisième chapitre que les procyanidines n'induisent pas de changement dans la structure du sol. Ce qui signifie qu'il n'y a pas d'action couplée de

l'effet sur les dénitrifiants *via* le BDI avec une modulation du sol et donc de leurs habitats qui engendrait des changements abiotiques affectant la dénitrification.

Il faut alors prendre en compte que de tels essais sont soumis à énormément de variables que cela soit au niveau des plantes et/ou des microorganismes mais aussi des facteurs abiotiques. Cette variabilité peut changer l'efficacité d'un phénomène comme le BDI d'un essai à l'autre.

1.2 La qualité des cultures n'est pas modifiée par un amendement en procyanidines

L'amendement en procyanidines, en plus d'avoir augmenté la productivité des cultures n'a pas changé leurs qualités. Nous savons que le céleri et la laitue sont sensibles aux concentrations de nitrate dans le sol. En effet, comme l'explique [Santamaria et al. \(1999\)](#) et [Santamaria \(2006\)](#), ces deux cultures voient leur concentration d'azote dans les tissus augmenter lorsque la concentration de nitrate dans le sol est importante, impliquant ainsi des dangers potentiels pour le consommateur si les concentrations s'avèrent trop élevées ([Anjana and Iqbal, 2007](#)). Dans notre cas, nous n'avons pas observé de changement au niveau de la teneur en azote entre les témoins et les cultures amendées en procyanidines quel que soit le type de culture. Dans le cas du céleri, il y avait significativement moins d'azote dans les tissus comparé aux cultures avec engrais conventionnel. Or, une surconcentration pouvant amener dès lors des risques pour la santé ([Wright et al., 1999](#); [Sindelar and Milkowski, 2012](#)) ; cela suggère qu'un amendement en procyanidines n'induit pas de surconcentration dans les tissus d'azote et *in-fine* de nitrate pouvant être dangereux pour la consommation, et peut par ailleurs représenter moins de risques qu'une culture conventionnelle.

De même, nous n'avons pas observé de différence quant à la ténacité des feuilles avec le témoin lorsqu'il y a eu amendement en procyanidines, cela est potentiellement intéressant pour le consommateur, car cela suggère que la qualité de mâche des produits n'est pas affectée ([Lopez-Galvez et al., 1997](#); [Rico et al., 2007](#)) mais aussi que leur vulnérabilité en champs face aux ravageurs et à l'herbivorie ne diffèrent pas ([Clissold et al., 2009](#)). Cependant, lors de l'essai céleri nous avons remarqué une diminution de la pigmentation en chlorophylle lorsqu'ils sont amendés en procyanidines et non en engrais. De ce fait, le consommateur habitué aux produits issus de l'agriculture conventionnelle pourrait ne pas être attiré par ce type d'aliment potentiellement moins attrayant. C'est pourquoi il serait intéressant de faire une enquête auprès d'un panel de consommateurs potentiels en ce qui concerne la gustativité et par extension de la qualité de mâche également, ainsi que de l'attrait esthétique d'une

plante issue d'une agriculture essayant de s'affranchir de l'agriculture intensive avec ses problématiques associées, réduisant les pertes d'azote sous forme de N₂O dans les champs.

1.3 Affiner les méthodes d'applications des procyanidines

Si l'on se réfère à la définition de [du Jardin, \(2015\)](#) expliquant qu'un biostimulant est une substance bénéfique pour les plantes, à l'exclusion des nutriments, des pesticides et des amendements pour les sols, il est possible de classer les procyanidines comme biostimulants. Cependant, comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la majorité des molécules de type biostimulant, sont essentiellement appliquées en complément d'engrais et ne sont que peu souvent apportées comme unique amendement ([UNIFA, 2014](#)). Durant cette thèse, nous avons testé l'efficacité des procyanidines en tant qu'amendement seul en comparaison à des cultures non amendées voire amendées de façon conventionnelle. Les procyanidines en amendement seul induisent *via* le BDI une augmentation de productivité qui peut dans certains cas être suffisant pour une commercialisation. Cependant la possibilité de remplacer totalement les engrais dans l'agriculture actuelle semble utopique, tant elle s'avère intensive et économique, les sols n'ont pas le temps de se régénérer entre chaque culture et les rendements sont essentiels à la viabilité économique des producteurs ([Tilman et al., 2002](#)). Encore une fois, l'utilisation d'un biostimulant et dans notre cas de procyanidines demande une évolution dans les pratiques agricoles actuelles. Cependant, il est nettement plus envisageable de diminuer les apports d'engrais classiques en les complétant avec des apports en procyanidines. Ceci permettra de diminuer le nombre et/ou la quantité d'apports d'engrais. En effet, comme nous l'avons vu pour le céleri, qui demande deux apports importants d'engrais azotés, nous pourrions dès lors par la même occasion dans de prochains travaux tester l'efficacité d'un apport en procyanidines suivi d'un deuxième apport cette fois ci d'engrais ou inversement.

De manière conventionnelle les méthodes de culture d'une plante à l'autre peuvent différer, durant ce doctorat nous avons testé des plantes où la méthode d'arrosage, d'apport d'engrais et dont la partie consommée - à savoir la partie aérienne foliaire- était la même. A la fin de cette thèse et dans le cadre du stage de Lyna Bouladra (Licence professionnelle Microbiologie Industrielle et Biotechnologie), nous avons testé une culture fruitière comme la tomate (*Solanum lycopersicum*) qui a de plus la particularité d'avoir un système d'arrosage au goutte à goutte différent des cultures que nous avons étudiées jusqu'ici. Le but ici est d'apporter

d'une autre manière les procyanidines en sol et de voir l'effet des procyanidines sur la productivité d'un autre organe que la partie végétative à savoir le fruit. Les premiers résultats sur la tomate ne nous permettent pas de démontrer des différences entre parcelles amendées et non amendées. Il serait intéressant d'affiner le protocole d'apport des procyanidines pour une prochaine expérimentation.

Cependant, avant une application de type agricole, la première étape sera de trouver une source de procyanidines plus économique (objectif d'un projet de maturation dans le cadre d'un brevet en 2016). En effet, lors de nos essais nous avons utilisé des procyanidines commerciales (Laffort TANIN VR GRAPE., Bordeaux, France) qui ne sont pas un produit créé pour ce type d'utilisation et représentent une source bien trop onéreuse. Ces procyanidines de chez Laffort sont utilisées comme source de tannins à rajouter dans des vins trop pauvres de ces composés ([Harbertson et al., 2012](#)). Dans le contexte d'une agriculture durable avec des enjeux économiques, il existe d'autres sources de procyanidines moins coûteuses et plus concentrées en procyanidines, comme le mimosa, l'écorce de quebracho ou les pépins de raisins ([Thompson et Pizzi, 1995](#) ; [Gabetta et al., 2000](#) ; [Venter et al., 2012](#); [Vivas et al., 2004](#)) Il est de même envisageable de valoriser les rhizomes de *Fallopia* contenant beaucoup de procyanidines ([Bardon, 2014](#) ; [Rouifed et al., 2018](#)). L'avantage serait alors double car nous aurions une source importante à faible coût, tout en participant à la gestion contre cette plante invasive. Dans tous les cas, des études futures utilisant ces sources de procyanidines sur le terrain et évaluant les avantages/coûts de ces applications seront nécessaires.

2. Mieux comprendre les mécanismes du BDI

2.1 Le phénomène du BDI peut-il être dû à d'autres métabolites secondaires ?

[Subbarao et al. \(2007\)](#) expliquent que l'inhibition biologique de la nitrification (BNI) est une stratégie végétale présente chez plusieurs plantes et opérée par plusieurs molécules.

Cela pourrait alors apporter un élément de réponse dans le cas d'*A. thaliana* observée pendant cette thèse, où nous avons démontré une inhibition de la dénitrification sans toutefois montrer de productions aux niveaux racinaires de procyanidines. Il est alors éventuellement plausible que le phénomène de BDI soit opéré aussi par d'autres molécules et ne soit pas exclusif aux procyanidines.

Dans le cas de nos études sur *A. thaliana*, des molécules flavonoïques de type kaempferol ont été détectées par uHPLC-qTof comme étant un composé très présent dans les racines. D'un

point de vue de conformation de la molécule, celle-ci est relativement proche des procyanidines (Peterson, 2001). Sans compter que des études montrent que le kaempferol peut avoir des effets spécifiques et inhibiteurs sur des enzymes bactériens comme *NorA* chez *Staphylococcus aureus* (Holler et al., 2012). Il serait alors intéressant de tester cette molécule sur une bactérie dénitrifiante et sur une bactérie non dénitrifiante pour détecter une potentielle inhibition de l'activité de dénitrification, mais aussi d'approfondir les recherches sur d'autres phénomènes d'inhibition de la dénitrification pour en connaître la cause, les mécanismes et les molécules impliquées afin d'établir ces processus comme étant un BDI ou non.

2.2 Comment les plantes réagissent-elles au BDI ?

Nous avons vu que certaines plantes ont ou pourraient avoir la capacité d'opérer la stratégie du BDI. Mais il est utile de comprendre comment la plante met en place un tel processus et comment elle réagit à celui-ci. La première partie de cette thèse avec l'utilisation d'*A. thaliana* devait répondre à ces questions, mais comme nous l'avons vu, faute de temps nous n'avons pas pu avancer dans ce sens. Cependant, l'étude de ce modèle nous permet de dégager quelques pistes. En effet, nous avons vu que *A. thaliana*, comme d'autres espèces végétales, possède la voie métabolique à la formation de procyanidines (Abrahams et al., 2002). Un élément extrêmement intéressant réside dans la régulation au tout début de la voie des anthocyanes où le facteur de régulation LBD (Lateral Organ Boundaries Domain) sensible aux concentrations de nitrate dans le milieu induit l'activation de la suite de la voie (Rubin et al., 2009; Soubeyrand et al., 2014). Rubin et al. (2009) expliquent alors que dans un environnement pauvre en nitrate, le facteur LBD s'active et enclenche la production des anthocyanes et *in-fine* des procyanidines. D'un point de vue mécanistique, cela pourrait être le fruit d'une réponse de la plante à un milieu pauvre en nitrate extrêmement propice à la compétition avec les microorganismes dénitrifiants (Kuzakov and Xu, 2013). Ce type de réponse est déjà observé au niveau du BNI, où Subbarao et al., (2008) expliquent que la synthèse de la molécule inhibitrice est induite par la présence de NH_4^+ en contact avec les racines. Il serait alors intéressant, à défaut de démontrer une production de procyanidines chez *A. thaliana*, de tester des mutants affectés dans le facteur LBD et d'analyser en parallèle l'activité de dénitrification pour valider cette hypothèse.

De plus, nous avons également vu dans la littérature que les procyanidines chez *A. thaliana* sont présentes principalement dans le tégument des graines (Debeaujon et al., 2003; Baudry et al., 2004). Une hypothèse serait alors l'existence d'un « effet maternel ». En effet, il serait intéressant de doser les procyanidines dans les graines d'*A. thaliana* dans des conditions de cultures différentes, et voir si la concentration en procyanidines des graines varie en fonction de la concentration en nitrate du sol de culture de la plante mère. Dans ce cas, il serait envisageable que la plante, dans un stress de compétition avec les microorganismes pour le nitrate, alloue une protection à sa descendance pour une meilleure installation dans cette niche écologique, en modulant la concentration de procyanidines dans les téguments des graines.

Dans un autre registre, un phénomène intéressant s'est dégagé lors des essais en champs. En effet, nous avons observé dans certains cas que les cultures que nous avons amendées en procyanidines avait un gain de masse racinaire plus important que la masse aérienne. Nous avons lors du deuxième chapitre écarté l'effet direct des procyanidines sur le développement racinaire. En effet, l'absence de différences entre les plants de laitue cultivés en milieu stérile avec et sans procyanidines permet de conclure que les procyanidines ne sont pas une source de carbone et/ou une phytohormone impliquée dans le développement racinaire. Il faut alors noter que dans les sols, la distribution des communautés dénitrifiantes est hétérogène et est présente en « spot » dans le sol (Harms et al., 2009; Philippot et al., 2009). Dans ce cas, il est probable que les procyanidines aient rendu disponible le nitrate au niveau de ces spots éparpillés de façon hétérogène dans le sol poussant dès lors les racines à croître davantage pour « chercher » ce nitrate. Ce phénomène avait déjà été observé dans les études de Bardon et al. (2017) constatant une croissance racinaire supérieure à celle aérienne chez *Fallopia sp.* après un ajout exogène de procyanidines. D'un point de vue appliqué, cela pourrait être alors intéressant de tester des légumes « racines » pour exploiter ce phénomène et induire une meilleure productivité au niveau d'un système racinaire de cultures d'intérêt agricole.

2.3 Comment les bactéries dénitrifiantes réagissent-elles aux procyanidines ?

Nous avons observé lors de tous les essais que les procyanidines affectent négativement l'abondance des bactéries dénitrifiantes. Il a été démontré que les procyanidines *via* le BDI inhibent la première étape de la dénitrification à savoir la transformation du nitrate en nitrite *via* la modification de la conformation de l'enzyme transmembranaire NO_3^- réductase (Bardon

et al., 2014) induisant ainsi une perte de la fonction de dénitrification. Notre hypothèse est que dans la rhizosphère, cette perte de fonction entraîne un manque de compétitivité des bactéries dénitrifiantes et serait alors contre-sélectionnée dans la rhizosphère des plantes amendées en procyanidines. Les bactéries dénitrifiantes ne pourraient donc plus utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons, ce qui réduirait leurs multiplications et leurs installations dans cette niche écologique, comme observé précédemment par Dassonville et al. (2011).

Bien que lors de l'essai céleri nous avons observé un BDI moins marqué lorsque l'apport de procyanidines en sol était effectué plus longtemps avant, il n'a pas été testé le devenir de la molécule dans le sol ni son temps de demi-vie. Il est alors possible que ces molécules soient transformées en monomères catéchines (Contreras-Domínguez et al., 2006) ou alors lessivées dans le sol. Il ne faut néanmoins pas exclure la possibilité que les communautés bactériennes dénitrifiantes s'adaptent à une application de procyanidines. Ce résultat suggère que l'effet des procyanidines sur l'activité dénitrifiante s'estompe en relativement peu de temps, tel que décrit par Zerulla (2000), qui a montré un retour à l'activité initiale de nitrification des communautés bactériennes du sol 4 à 10 semaines après l'ajout du phosphate de 3,4-diméthylpyrazole (DMPP), un inhibiteur de nitrification, au sol. Il sera pour la suite primordial de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette résilience et voir si elle provient du devenir de la molécule ou d'une adaptation de la communauté dénitrifiante.

Ainsi, la résilience semble exister dans les systèmes que nous avons testé. Nous pouvons, cependant, nous interroger sur les conséquences à plus long terme et sur des phénomènes de résistance des bactéries dénitrifiantes.

Il a été démontré par plusieurs études que certaines bactéries sont capables de dégrader le monomère des procyanidines à savoir les catéchines (Arunachalam et al., 2003; Bhat et al., 1998). Il est alors très intéressant de noter que les études démontrant cette dégradation l'ont fait sur des bactéries classifiées comme dénitrifiantes, alors que ces microorganismes ne représentent que 10 à 15% des bactéries du sol (Bothe et al., 2006; Casella and Payne, 1996), soit une minorité au sein de la communauté totale du sol. Il est alors possible qu'il y ait eu une pression de sélection des plantes exerçant le BDI sur les microorganismes dénitrifiants les contraignant à adopter cette capacité à dégrader les composés proches des procyanidines pour résister à l'inhibition. On peut d'ailleurs noter de façon très intéressante que les études de Bhat et al. (1998) et Wang et al. (2010) expliquent que la dégradation des catéchines par

les bactéries dénitrifiantes conduit à la formation d'acide protocatéchique un élément toxique pour les plantes. En effet l'acide protocatéchique peut réduire la production de chlorophylle comme le montre [Alsaadawi et al. \(1986\)](#) ; ou même, d'après l'étude de [Wang et al. \(2010\)](#), inhiber la germination des graines.

Ainsi, comme l'expliquent [Tong et al., \(2007\)](#), la dégradation de molécules toxiques par les bactéries est un moyen de défense de celles-ci pouvant être le résultat d'une course évolutive et d'une pression de sélection. Il est alors possible que certaines bactéries dénitrifiantes aient adopté une résistance face aux procyanidines et au BDI.

Si l'on s'intéresse plus précisément à nos essais, nous pouvons noter que bien que l'abondance des dénitrifiants semble affectée par les procyanidines, ce n'est pas le cas de l'abondance totale. Cela représente ainsi une information importante, démontrant que les procyanidines agissent spécifiquement sur les dénitrifiants et suggère que cette niche a été colonisée probablement par une autre communauté bactérienne (libération de l'espace et disponibilité des nutriments). Il est important de connaître la composition de la communauté bactérienne totale au niveau des plots amendés et non amendés en procyanidines. En effet, il a été amorcé à la fin de cette thèse une étude de la diversité de la communauté totale afin **déterminer si seulement l'abondance de la communauté bactérienne totale avait été affectée ou alors la diversité l'était aussi**. De plus, il serait intéressant de savoir quels sont les dénitrifiants impactés par le BDI, sachant que certains dénitrifiants sont aussi des PGPR. Est-ce que la plante, face à une compétition pour le nitrate, sacrifie son interaction positive avec les PGPR dénitrifiants ? De plus, nos études se sont appuyées sur l'utilisation d'amorces ciblant les gènes *nirK* et *nirS* des communautés bactériennes issus des travaux de [Bru et al. \(2011\)](#). Or, de récentes études expliquent que la détection des dénitrifiants nécessite une batterie bien plus importante d'amorces pour *nirK* et *nirS* afin de cibler la totalité des dénitrifiants ([Ma et al. 2019](#)). De ce fait, en étayant les amorces utilisées nous serions en mesure de déterminer si les dénitrifiants sont tous impactés ou non par l'ajout de procyanidines.

Conclusion

Ce doctorat nous a permis de démontrer qu'il était possible de transposer la stratégie végétale du BDI en champs et d'avoir un retour à la plante du nitrate détourné induisant une amélioration de productivité.

Ce gain de productivité a été observé sur deux types de sols, deux cultures, et à différents moments, illustrant que cette méthode semble efficace en champs.

Toutefois, l'ensemble de ce travail ne représente que les prémices des études avant une potentielle utilisation à plus grande échelle. Bien que l'application fût efficace ici il faudrait tester sur d'autres types de sols et d'autres types de cultures pour pouvoir généraliser et réglementer l'application.

Il est essentiel pour la suite de trouver une source de procyanidines peu onéreuse pour une application en champs. Puis, comme nous l'avons évoqué, des essais impliquant des mélanges avec des engrais devront être testés pour estimer et quantifier une potentielle diminution des apports d'engrais azotés voire leurs substitutions.

D'un point de vue fondamental il sera essentiel de poursuivre les expérimentations avec *A. thaliana* en créant un mutant producteur de procyanidines pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, mais aussi tester l'hypothèse d'un déclenchement de la production en absence de nitrate ainsi qu'un potentiel rôle d'un autre métabolite secondaire dans l'induction du BDI. Il sera aussi nécessaire d'affiner les méthodes de détection dans le sol pour connaître le devenir des procyanidines dans celui-ci.

Le BDI est une stratégie découverte récemment, et il est fort probable que dans les années à venir d'autres plantes et d'autres molécules impliquées dans l'inhibition soient mises en évidence.

Et dans ce cas, il serait intéressant de réitérer des essais du même type avec une autre molécule ayant les mêmes effets dans le futur.

Dans notre cas, les bactéries dénitrifiantes semblent résilientes au phénomène de BDI ; et à l'avenir, il sera essentiel de mieux comprendre les réactions de ces microorganismes, les phénomènes de résilience et résistance induits par la stratégie de BDI dans des systèmes contrôlés d'abord puis dans les agrosystèmes.

REFERENCES:

- Abalos, D., Jeffery, S., Sanz-Cobena, A., Guardia, G., Vallejo, A., 2014. Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 189, 136–144.
- Abeliovich, A., 2006. The nitrite oxidizing bacteria. *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* 861–872.
- Abrahams, S., Tanner, G.J., Larkin, P.J., Ashton, A.R., 2002. Identification and biochemical characterization of mutants in the proanthocyanidin pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130, 561–576.
- Achouak, W., Abrouk, D., Guyonnet, J., Barakat, M., Ortet, P., Simon, L., Lerondelle, C., Heulin, T., Haichar, F. el Z., 2019. Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS microbiology ecology* 95, fiz021.
- Adamson, G.E., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Prior, R.L., Cao, G., Jacobs, P.H., Kremers, B.G., Hammerstone, J.F., Rucker, R.B., Ritter, K.A., 1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4184–4188.
- Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., Kloepper, J.W., 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology* 54, 876–886.
- Aguilera, A.G., Alpert, P., Dukes, J.S., Harrington, R., 2010. Impacts of the invasive plant *Fallopia japonica* (Houtt.) on plant communities and ecosystem processes. *Biological Invasions* 12, 1243–1252.
- Akiyama, H., Yan, X., Yagi, K., 2010. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N₂O and NO emissions from agricultural soils: meta-analysis. *Global Change Biology* 16, 1837–1846.
- Alsaadawi, I.S., Al-Hadithy, S.M., Arif, M.B., 1986. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and ions uptake in cowpea seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 12, 221–227.
- Anjana, S.U., Iqbal, M., 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agronomy for sustainable development* 27, 45–57.
- Arunachalam, M., Mohan, N., Sugadev, R., Chellappan, P., Mahadevan, A., 2003. Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1621, 261–265.
- Bardon, C., 2014. Inhibition biologique de la dénitrification (BDI) par des métabolites secondaires du complexe d'espèces *Fallopia* spp. (PhD Thesis). Université Claude Bernard-Lyon I.
- Bardon, C., Piola, F., Bellvert, F., Haichar, F. el Z., Comte, G., Meiffren, G., Pommier, T., Puijalon, S., Tsafack, N., Poly, F., 2014. Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites. *New Phytologist* 204, 620–630.
- Bardon, C., Piola, F., Haichar, F.Z., Meiffren, G., Comte, G., Missery, B., Balby, M., Poly, F., 2016a. Identification of B-type procyanidins in *F. allopia* spp. involved in biological denitrification inhibition. *Environmental microbiology* 18, 644–655.

- Bardon, C., Poly, F., el Zahar Haichar, F., Le Roux, X., Simon, L., Meiffren, G., Comte, G., Rouifed, S., Piola, F., 2017. Biological denitrification inhibition (BDI) with procyanidins induces modification of root traits, growth and N status in *Fallopia x bohemica*. *Soil Biology and Biochemistry* 107, 41–49.
- Bardon, C., Poly, F., Piola, F., Pancton, M., Comte, G., Meiffren, G., Haichar, F. el Z., 2016b. Mechanism of biological denitrification inhibition: procyanidins induce an allosteric transition of the membrane-bound nitrate reductase through membrane alteration. *FEMS microbiology ecology* 92.
- Barker, D.G., Chabaud, M., Russo, G., Genre, A., 2017. Nuclear Ca^{2+} signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals. *New Phytol* 214, 533–538. <https://doi.org/10.1111/nph.14350>
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L., 2004. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39, 366–380.
- Beatty, P.H., Good, A.G., 2011. Future Prospects for Cereals That Fix Nitrogen. *Science* 333, 416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>
- Beau, J.-M., 2011. Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors: synthesis and agricultural perspectives. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 65, 45–48.
- Beaumont, H.J., Van Schooten, B., Lens, S.I., Westerhoff, H.V., Van Spanning, R.J., 2004. *Nitrosomonas europaea* expresses a nitric oxide reductase during nitrification. *Journal of bacteriology* 186, 4417–4421.
- Begum, A.A., Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F., 2001. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52, 1537–1543.
- Bernadet, S., 2017. Laitue. Laitues d'été: malgré une récolte 2017 assez faible, un redressement des prix uniquement sur la fin de la campagne.
- Bhat, T.K., Singh, B., Sharma, O.P., 1998. Microbial degradation of tannins—a current perspective. *Biodegradation* 9, 343–357.
- Bloom, A.J., 2015. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current opinion in plant biology* 25, 10–16.
- Bloom, A.J., Meyerhoff, P.A., Taylor, A.R., Rost, T.L., 2002. Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 416–431.
- Bonfante, P., Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1, 48.
- Boserup, E., 2017. The conditions of agricultural growth: The economics of agrarian change under population pressure. Routledge.
- Bothe, H., Ferguson, S., Newton, W.E., 2006. *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier.
- Bouwman, A.F., Boumans, L.J.M., Batjes, N.H., 2002. Estimation of global NH_3 volatilization loss from synthetic fertilizers and animal manure applied to arable lands and grasslands. *Global Biogeochemical Cycles* 16, 8–1.
- Bouwman, A.F., Van Dreht, G., Van der Hoek, K.W., 2005. Surface N balances and reactive N loss to the environment from global intensive agricultural production systems for the period 1970–2030. *Science in China Series C: Life Sciences* 48, 767–779.
- Bowers, W., 1992. Agricultural field equipment. *Energy in farm production* 6, 117–129.

- Bradley, R.L., Titus, B.D., Preston, C.P., 2000. Changes to mineral N cycling and microbial communities in black spruce humus after additions of (NH₄)₂SO₄ and condensed tannins extracted from *Kalmia angustifolia* and balsam fir. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1227–1240.
- Bräunlich, M., Slimestad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K., Barsett, H., 2013. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 5, 663–678.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159, 567–584.
- Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P.A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arrouays, D., Philippot, L., 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *The ISME journal* 5, 532.
- Bullock, D.G., 1992. Crop rotation. *Critical reviews in plant sciences* 11, 309–326.
- Burns, R.C., Hardy, R.W., 2012. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Science & Business Media.
- Cabrera, M.L., Kissel, D.E., Vigil, M.F., 2005. Nitrogen Mineralization from Organic Residues: Research Opportunities. *J. ENVIRON. QUAL.* 34, 5.
- Calderon-Montano, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry* 11, 298–344.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil* 383, 3–41.
- Cammalleri, C., Anderson, M.C., Gao, F., Hain, C.R., Kustas, W.P., 2014. Mapping daily evapotranspiration at field scales over rainfed and irrigated agricultural areas using remote sensing data fusion. *Agricultural and forest meteorology* 186, 1–11.
- Caranto, J.D., Lancaster, K.M., 2017. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 8217–8222.
- Carlström, M., Persson, A.E.G., Larsson, E., Hezel, M., Scheffer, P.G., Teerlink, T., Weitzberg, E., Lundberg, J.O., 2010. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. *Cardiovascular research* 89, 574–585.
- Casella, S., Payne, W.J., 1996. Potential of denitrifiers for soil environment protection. *FEMS microbiology letters* 140, 1–8.
- Cassman, K.G., Dobermann, A., Walters, D.T., 2002. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 31, 132–141.
- Cavigelli, M.A., Robertson, G.P., 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81, 1402–1414.
- Chang, J.-H., 2017. *Climate and agriculture: an ecological survey*. Routledge.
- Charlier, R.H., Morand, P., Finkl, C.W., 2008. How Brittany and Florida coasts cope with green tides. *International Journal of Environmental Studies* 65, 191–208.
- Charlier, R.H., Morand, P., Finkl, C.W., Thys, A., 2006. Green tides on the Brittany coasts, in: 2006 IEEE US/EU Baltic International Symposium. IEEE, pp. 1–13.
- Chojnacka, K., Wilk, R., Michalak, I., Rój, E., Górecka, H., Górecki, H., 2014. New algal biostimulant: from the extract to formulation, in: *Proceedings of the 5th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation*, Rio de Janeiro, Brazil. pp. 25–28.

- Clark, M., Tilman, D., 2017. Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. *Environmental Research Letters* 12, 064016.
- Clissold, F.J., Sanson, G.D., Read, J., Simpson, S.J., 2009. Gross vs. net income: how plant toughness affects performance of an insect herbivore. *Ecology* 90, 3393–3405.
- Contreras-Domínguez, M., Guyot, S., Marnet, N., Le Petit, J., Perraud-Gaime, I., Roussos, S., Augur, C., 2006. Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product. *Biochimie* 88, 1899–1908.
- Coskun, D., Britto, D.T., Shi, W., Kronzucker, H.J., 2017. How plant root exudates shape the nitrogen cycle. *Trends in plant science* 22, 661–673.
- Craigie, J.S., 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology* 23, 371–393.
- Craigie, J.S., MacKinnon, S.L., Walter, J.A., 2007. Liquid seaweed extracts identified using ^1H NMR profiles, in: *Nineteenth International Seaweed Symposium*. Springer, pp. 215–221.
- Crespi, M., Gálvez, S., 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of plant growth regulation* 19, 155–166.
- Dal Cortivo, C., Barion, G., Visioli, G., Mattarozzi, M., Mosca, G., Vamerali, T., 2017. Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247, 396–408.
- Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P., Poly, F., 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological invasions* 13, 1115–1133.
- De Ron, A.M., 2015. Grain legumes. Springer.
- De Vries, I.M., 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44, 165–174.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 122, 403–414.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., Lepiniec, L., 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell* 15, 2514–2531.
- Delgado, J.A., Mosier, A.R., 1996. Mitigation alternatives to decrease nitrous oxides emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux. *Journal of Environmental Quality* 25, 1105–1111.
- D'haeze, W., Holsters, M., 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12, 79R–105R.
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2012. How does the application of different nitrification inhibitors affect nitrous oxide emissions and nitrate leaching from cow urine in grazed pastures? *Soil Use and Management* 28, 54–61.
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient cycling in agroecosystems* 64, 237–256.
- Dietz, M., Machill, S., Hoffmann, H.C., Schmidtke, K., 2013. Inhibitory effects of *Plantago lanceolata* L. on soil N mineralization. *Plant and Soil* 368, 445–458.
- Dixon, R.A., Xie, D.-Y., Sharma, S.B., 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New phytologist* 165, 9–28.

- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, Biostimulants in Horticulture 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- du Jardin, P., 2012. The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis, Ad hoc study report. European Commission.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., Nardi, S., 2014. *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00375>
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2003. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu). *Australian Journal of Agricultural Research* 54, 377–380.
- Evenson, R.E., Gollin, D., 2003. Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *science* 300, 758–762.
- Fangueiro, D., Fernandes, A., Coutinho, J., Moreira, N., Trindade, H., 2009. Influence of Two Nitrification Inhibitors (DCD and DMPP) on Annual Ryegrass Yield and Soil Mineral N Dynamics after Incorporation with Cattle Slurry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 40, 3387–3398. <https://doi.org/10.1080/00103620903325976>
- Fathy, M.A., Gabr, M.A., El Shall, S.A., 2010. Effect of humic acid treatments on 'Canino' apricot growth, yield and fruit quality. *New York Science Journal* 3, 109–115.
- Federico, G., 2010. Feeding the world: an economic history of agriculture, 1800-2000. Princeton University Press.
- Fenger, J., 2009. Air pollution in the last 50 years—From local to global. *Atmospheric environment* 43, 13–22.
- Fortin, D., 2006. L'annedda ou «l'arbre de vie»: Cherchez le conifère. *Continuité* 15–17.
- Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil* 321, 35–59.
- Gabetta, B., Fuzzati, N., Griffini, A., Lolla, E., Pace, R., Ruffilli, T., Peterlongo, F., 2000. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* 71, 162–175.
- Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B., 2010. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2058–2067. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021>
- Gerhardt, K.E., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant science* 176, 20–30.
- Geurts, R., Bisseling, T., 2002. Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell* 14, S239–S249.
- Gezgin, S., Bayraklı, F., 1995. Ammonia volatilization from ammonium sulphate, ammonium nitrate, and urea surface applied to winter wheat on a calcareous soil. *Journal of plant nutrition* 18, 2483–2494.
- Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S., 2009. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination , Seedling Growth and Yield of Maize [WWW Document]. URL [/paper/The-Effect-of-Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria-Gholami-Shahsavani/4596e88259d9c4adbc555e3ead192d068e8068dd](http://paper/The-Effect-of-Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria-Gholami-Shahsavani/4596e88259d9c4adbc555e3ead192d068e8068dd) (accessed 6.16.19).

- Gilmour, J.T., Cogger, C.G., Jacobs, L.W., Evanylo, G.K., Sullivan, D.M., 2003. Decomposition and plant-available nitrogen in biosolids. *Journal of Environmental Quality* 32, 1498–1507.
- Gilsanz, C., Báez, D., Misselbrook, T.H., Dhanoa, M.S., Cárdenas, L.M., 2016. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 216, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.030>
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology* 41, 109–117.
- Gliński, J., Brzezińska, M., Włodarczyk, T., 2004. Microbial ecology of soil porous medium. *SOIL–PLANT–ATMOSPHERE AERATION AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS* 65.
- Gould, K.S., 2004. Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *BioMed Research International* 2004, 314–320.
- Gould, W.D., Hagedorn, C., McCready, R.G.L., 1986. Urea transformations and fertilizer efficiency in soil, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 209–238.
- Goulding, K., 2000. Nitrate leaching from arable and horticultural land. *Soil use and management* 16, 145–151.
- Graham, T.L., 1998. Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36, 135–144.
- Green, L.C., De Luzuriaga, K.R., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78, 7764–7768.
- Greer, F.R., Shannon, M., 2005. Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics* 116, 784–786.
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering* 18, 223–244.
- Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W., 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* 77, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., Yermiyahu, U., 2015. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 141–174.
- Halvorson, J.J., Gonzalez, J.M., Hagerman, A.E., 2011. Repeated applications of tannins and related phenolic compounds are retained by soil and affect cation exchange capacity. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1139–1147.
- Harbertson, J.F., Parpinello, G.P., Heymann, H., Downey, M.O., 2012. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry* 131, 999–1008.
- Harms, T.K., Wentz, E.A., Grimm, N.B., 2009. Spatial heterogeneity of denitrification in semi-arid floodplains. *Ecosystems* 12, 129–143.
- Havlin, J.L., Kissel, D.E., Maddux, L.D., Claassen, M.M., Long, J.H., 1990. Crop rotation and tillage effects on soil organic carbon and nitrogen. *Soil Science Society of America Journal* 54, 448–452.
- 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.

- Herbert, R.A., 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews* 23, 563–590.
- Heumann, S., Rimmer, D.L., Schlichting, A., Abbott, G.D., Leinweber, P., Böttcher, J., 2013. Effects of potentially inhibiting substances on C and net N mineralization of a sandy soil—a case study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176, 35–39.
- Heumann, S., Ringe, H., Böttcher, J., 2011. Field-specific simulations of net N mineralization based on digitally available soil and weather data: II. Pedotransfer functions for the pool sizes. *Nutrient cycling in agroecosystems* 91, 339–350.
- Hignett, T.P., 1985. History of chemical fertilizers, in: *Fertilizer Manual*. Springer, pp. 3–10.
- Hijri, M., 2016. Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26, 209–214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>
- Hobbie, S.E., 1992. Effects of plant species on nutrient cycling. *Trends in ecology & evolution* 7, 336–339.
- Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A., 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in plant science* 5, 304–308.
- Hoffman, B.M., Lukyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R., Seefeldt, L.C., 2014. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chemical reviews* 114, 4041–4062.
- Holler, J.G., Christensen, S.B., Slotved, H.-C., Rasmussen, H.B., Gúzman, A., Olsen, C.-E., Petersen, B., Mølgaard, P., 2012. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 1138–1144.
- Hord, N.G., Tang, Y., Bryan, N.S., 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical nutrition* 90, 1–10.
- Iwashina, T., 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113, 287–299.
- Jamagne, M., 2011. *Grands paysages pédologiques de France*. Éditions Quae.
- Janssen, B.H., 1996. Nitrogen mineralization in relation to C: N ratio and decomposability of organic materials, in: *Progress in Nitrogen Cycling Studies*. Springer, pp. 69–75.
- Jefimova, J., Irha, N., Reinik, J., Kirso, U., Steinnes, E., 2014. Leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from oil shale processing waste deposit: a long-term field study. *Science of the Total Environment* 481, 605–610.
- Jiménez, D.J., Montaña, J.S., Martínez, M.M., 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 846–858.
- Joanisse, G.D., Bradley, R.L., Preston, C.M., Bending, G.D., 2009. Sequestration of soil nitrogen as tannin–protein complexes may improve the competitive ability of sheep laurel (*Kalmia angustifolia*) relative to black spruce (*Picea mariana*). *New Phytologist* 181, 187–198.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil* 363, 411–419.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., den Camp, H.J.O., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* 479, 127.

- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B., 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology* 20, 1–9.
- Khakipour, N., Khavazi, K., Mojallali, H., Pazira, E., Asadirahmani, H., 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 4, 687–692.
- Khalil, K., 2003. Emissions de N₂O par nitrification et dénitrification à l'échelle de la motte de sol: effet de la structure du sol, de l'aération et des activités microbiennes (PhD Thesis). Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J., Prithiviraj, B., 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 386–399.
- Kiiski, H., 2009. Properties of ammonium nitrate based fertilisers.
- Kitamura, S., Shikazono, N., Tanaka, A., 2004. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 37, 104–114.
- Knops, J.M.H., Bradley, K.L., Wedin, D.A., 2002. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. *Ecology Letters* 5, 454–466.
- Kononen, K., 2001. Eutrophication, harmful algal blooms and species diversity in phytoplankton communities: examples from the Baltic Sea. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 30, 184–190.
- Kopta, T., Pavlikova, M., Şekara, A., Pokluda, R., Maršálek, B., 2018. Effect of Bacterial-algal Biostimulant on the Yield and Internal Quality of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Produced for Spring and Summer Crop. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46, 615–621.
- Kraft, B., Strous, M., Tegetmeyer, H.E., 2011. Microbial nitrate respiration—genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of biotechnology* 155, 104–117.
- Kraus, T.E., Dahlgren, R.A., Zasoski, R.J., 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems—a review. *Plant and Soil* 256, 41–66.
- Krebs, C., Gerber, E., Matthies, D., Schaffner, U., 2011. Herbivore resistance of invasive *Fallopia* species and their hybrids. *Oecologia* 167, 1041–1052.
- Kuzyakov, Y., Xu, X., 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* 198, 656–669.
- La Torre, A., Battaglia, V., Caradonia, F., 2016. An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 727–734.
- Landry, D., Dousset, S., Fournier, J.-C., Andreux, F., 2005. Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romanée, 21-France). *Environmental Pollution* 138, 191–200.
- Larsson, S.C., Bergkvist, L., Wolk, A., 2006. Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *International Journal of Cancer* 119, 915–919.
- Lazarus, S.A., Adamson, G.E., Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H., 1999. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3693–3701.
- Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* 149, 243–247.

- Lecomte, S., Achouak, W., Abrouk, D., Heulin, T., Nesme, X., Haichar, F. el Z., 2018. Diversifying anaerobic respiration strategies to compete in the rhizosphere. *Frontiers in Environmental Science* 6, 139.
- Lev-Yadun, S., Gould, K.S., 2008. Role of anthocyanins in plant defence, in: *Anthocyanins*. Springer, pp. 22–28.
- Lewis Jr, W.M., Wurtsbaugh, W.A., Paerl, H.W., 2011. Rationale for control of anthropogenic nitrogen and phosphorus to reduce eutrophication of inland waters. *Environmental science & technology* 45, 10300–10305.
- Limpens, E., van Zeijl, A., Geurts, R., 2015. Lipochitooligosaccharides Modulate Plant Host Immunity to Enable Endosymbioses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120149>
- Lin, B.-L., Sakoda, A., Shibasaki, R., Suzuki, M., 2001. A modelling approach to global nitrate leaching caused by anthropogenic fertilisation. *Water research* 35, 1961–1968.
- Lopez-Galvez, G., Peiser, G., Nie, X., Cantwell, M., 1997. Quality changes in packaged salad products during storage. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 205, 64–72.
- Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., Colla, G., 2015. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae* 182, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 63, 541–556.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Gladwin, M.T., 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 7, 156.
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.-F., Rees, R.M., Peyraud, J.-L., 2014. Potential of legume-based grassland–livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science* 69, 206–228.
- Lützow, M. v, Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions—a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426–445.
- Ma, Y., Zilles, J.L., Kent, A.D., 2019. An evaluation of primers for detecting denitrifiers via their functional genes. *Environmental microbiology* 21, 1196–1210.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G., Dénarié, J., 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469, 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Marsden, K.A., Scowen, M., Hill, P.W., Jones, D.L., Chadwick, D.R., 2015. Plant acquisition and metabolism of the synthetic nitrification inhibitor dicyandiamide and naturally-occurring guanidine from agricultural soils. *Plant and soil* 395, 201–214.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology* 17, 458–466.
- Matson, P.A., Naylor, R., Ortiz-Monasterio, I., 1998. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. *Science* 280, 112–115.
- Mattoo, A.K., Teasdale, J.R., 2010. Ecological and Genetic Systems Underlying Sustainable Horticulture, in: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*, Volume 37. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 331–362. <https://doi.org/10.1002/9780470543672.ch6>

- McTavish, H., Arciero, D.M., Hooper, A.B., 1995. Interaction with Membranes of Cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea*. *Archives of biochemistry and biophysics* 324, 53–58.
- Meijide, A., Díez, J.A., Sánchez-Martín, L., López-Fernández, S., Vallejo, A., 2007. Nitrogen oxide emissions from an irrigated maize crop amended with treated pig slurries and composts in a Mediterranean climate. *Agriculture, ecosystems & environment* 121, 383–394.
- Merino, P., Menéndez, S., Pinto, M., González-Murua, C., Estavillo, J.M., 2005. 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate reduces nitrous oxide emissions from grassland after slurry application. *Soil Use and Management* 21, 53–57.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., Rój, E., 2016. Evaluation of Supercritical Extracts of Algae as Biostimulants of Plant Growth in Field Trials. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01591>
- Miller, R., Owens, S.J., Rørslett, B., 2011. Plants and colour: flowers and pollination. *Optics & Laser Technology* 43, 282–294.
- Minami, T., Esipenko, N.A., Zhang, B., Kozelkova, M.E., Isaacs, L., Nishiyabu, R., Kubo, Y., Anzenbacher Jr, P., 2012. Supramolecular sensor for cancer-associated nitrosamines. *Journal of the American Chemical Society* 134, 20021–20024.
- Morot-Gaudry, J.-F., 1997. Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Editions Quae.
- Murrell, C., Gerber, E., Krebs, C., Parepa, M., Schaffner, U., Bossdorf, O., 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany* 98, 38–43.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T., 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7, 869.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., Lepiniec, L., 2000. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *The Plant Cell* 12, 1863–1878.
- Oenema, O., Witzke, H.P., Klimont, Z., Lesschen, J.P., Velthof, G.L., 2009. Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 133, 280–288.
- O'Sullivan, C.A., Fillery, I.R., Roper, M.M., Richards, R.A., 2016. Identification of several wheat landraces with biological nitrification inhibition capacity. *Plant and soil* 404, 61–74.
- Parađiković, N., Vinković, T., Vinković Vrček, I., Žuntar, I., Bojić, M., Medić-Šarić, M., 2011. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2146–2152. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4431>
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6, 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pasda, G., Hähndel, R., Zerulla, W., 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3, 4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biology and fertility of soils* 34, 85–97.
- Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M., 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411, 385–400.
- Pathak, H., Bhatia, A., Prasad, S., Singh, S., Kumar, S., Jain, M.C., Kumar, U., 2002. Emission of nitrous oxide from rice-wheat systems of Indo-Gangetic plains of India. *Environmental Monitoring and Assessment* 77, 163–178.

- Peterson, D.M., 2001. Oat antioxidants. *Journal of cereal science* 33, 115–129.
- Philippot, L., 2002. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Gene structure and expression* 1577, 355–376.
- Philippot, L., Čuhel, J., Saby, N.P., Chèneby, D., Chroňáková, A., Bru, D., Arrouays, D., Martin-Laurent, F., Šimek, M., 2009. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environmental microbiology* 11, 1518–1526.
- Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M., 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Current opinion in plant biology* 12, 267–274.
- Powlson, D.S., Addiscott, T.M., Benjamin, N., Cassman, K.G., De Kok, T.M., Van Grinsven, H., L'hirondel, J.-L., Avery, A.A., Van Kessel, C., 2008. When does nitrate become a risk for humans? *Journal of environmental quality* 37, 291–295.
- Prior, R.L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J., Reed, J., 2010. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1473–1478.
- Qiao, C., Liu, L., Hu, S., Compton, J.E., Greaver, T.L., Li, Q., 2015. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global change biology* 21, 1249–1257.
- Rabot, E., Wiesmeier, M., Schlüter, S., Vogel, H.-J., 2018. Soil structure as an indicator of soil functions: a review. *Geoderma* 314, 122–137.
- Radersma, S., Smit, A.L., 2011. Assessing denitrification and N leaching in a field with organic amendments. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 58, 21–29.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Portmann, R.W., 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326, 123–125.
- Reay, D.S., Davidson, E.A., Smith, K.A., Smith, P., Melillo, J.M., Dentener, F., Crutzen, P.J., 2012. Global agriculture and nitrous oxide emissions. *Nature climate change* 2, 410.
- Rees, D.C., Howard, J.B., 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current opinion in chemical biology* 4, 559–566.
- Regueiro, J., Sánchez-González, C., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J., Lamuela-Raventós, R., Izquierdo-Pulido, M., 2014. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. *Food chemistry* 152, 340–348.
- Reid, D.G., Bonnet, S.L., Kemp, G., van der Westhuizen, J.H., 2013. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 4: Solid state ¹³C NMR as a tool for in situ analysis of proanthocyanidin tannins, in heartwood and bark of quebracho and acacia, and related species. *Phytochemistry* 94, 243–248.
- Rengel, Z., 2001. Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32, 1163–1186.
- Richardson, D., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A., Baggs, E., 2009. Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle—could enzymic regulation hold the key? *Trends in biotechnology* 27, 388–397.
- Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C., 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 373–386.
- Roberts, T.L., 2008. Improving nutrient use efficiency. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32, 177–182.

- Rogers, C., Oldroyd, G.E.D., 2014. Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *Journal of Experimental Botany* 65, 1939–1946. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru098>
- Romieux, Y., 1993. L'arbre de vie qui a guéri du scorbut les compagnons de Jacques Cartier: Emmanuel Bévillon, Jacques Cartier, le scorbut et la bière de sapinette. *Revue d'Histoire de la Pharmacie* 81, 113–114.
- Ronen, E., 2016. Micro-elements in agriculture. *Practical Hydroponics and Greenhouses* 35.
- Rouified, S., Puijalon, S., Bardon, C., Meiffren, G., Buonomo, A., Sebei, N., Poussineau, S., Vallier, F., Shimoda, M., Piola, F., 2018. Comparison of defence and performance traits between one widespread clone and native populations in a major invasive plant species. *Diversity and Distributions* 24, 297–312.
- Routaboul, J.-M., Kerhoas, L., Debeaujon, I., Pourcel, L., Caboche, M., Einhorn, J., Lepiniec, L., 2006. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224, 96–107.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., Scheible, W.-R., 2009. Members of the LBD Family of Transcription Factors Repress Anthocyanin Synthesis and Affect Additional Nitrogen Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 3567–3584. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067041>
- Runge, C.F., Runge, C.P., 2010. Against the grain: why failing to complete the green revolution could bring the next famine. *Foreign Aff.* 89, 8.
- Russell, N.J., Gould, G.W., 2003. Food preservatives. Springer Science & Business Media.
- Ruzzi, M., Aroca, R., 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 124–134.
- Sahayaraj, K., Borgio, J.F., Raju, G., 2009. Antifungal activity of three fern extracts on causative agents of groundnut early leaf spot and rust diseases. *Journal of plant protection research* 49, 141–144.
- Salsac, L., 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 805–812.
- Sánchez, C., Minamisawa, K., 2018. Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (nirK) and cd 1-type (nirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS microbiology letters* 365, fny015.
- Santamaria, P., 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 10–17.
- Santamaria, P., Elia, A., Serio, F., Gonnella, M., Parente, A., 1999. Comparison between nitrate and ammonium nutrition in fennel, celery, and Swiss chard. *Journal of Plant Nutrition* 22, 1091–1106.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094–1117.
- Schwintzer, C.R., 2012. The biology of Frankia and actinorhizal plants. Elsevier.
- Seeberg-Elverfeldt, J., Schlüter, M., Feseker, T., Kölling, M., 2005. Rhizon sampling of porewaters near the sediment-water interface of aquatic systems. *Limnology and oceanography: Methods* 3, 361–371.
- Seiber, J.N., Coats, J., Duke, S.O., Gross, A.D., 2014. Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 11613–11619.
- Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., 2016. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. John Wiley & Sons.

- Sellstedt, A., Richau, K.H., 2013. Aspects of nitrogen-fixing *Actinobacteria*, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. FEMS Microbiol Lett 342, 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12116>
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J., 1992. Denitrification by fungi. FEMS Microbiology Letters 94, 277–281.
- Shrimali, M., Singh, K.P., 2001. New methods of nitrate removal from water. Environmental pollution 112, 351–359.
- Shuval, H.I., Gruener, N., 2013. Infant methemoglobinemia and other health effects of nitrates in drinking water, in: Proceedings of the Conference on Nitrogen As a Water Pollutant. Elsevier, pp. 183–193.
- Simpson, G.G., Dean, C., 2002. Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? science 296, 285–289.
- Sindelar, J.J., Milkowski, A.L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. Nitric oxide 26, 259–266.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P., 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review. African journal of agricultural research 9, 1265–1277.
- Smith, S., Habib, A., Kang, Y., Leggett, M., Diaz-Zorita, M., 2015. LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. Biological nitrogen fixation 1077–1086.
- Song, P., Wu, L., Guan, W., 2015. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. Nutrients 7, 9872–9895.
- Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., van Leeuwen, C., Delrot, S., Gomès, E., 2014. Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. Phytochemistry 103, 38–49.
- Stewart, W.M., Dibb, D.W., Johnston, A.E., Smyth, T.J., 2005. The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. Agronomy Journal 97, 1–6.
- Strebel, O., Duynisveld, W.H.M., Böttcher, J., 1989. Nitrate pollution of groundwater in western Europe. Agriculture, ecosystems & environment 26, 189–214.
- Subbarao, G.V., Arango, J., Masahiro, K., Hooper, A.M., Yoshihashi, T., Ando, Y., Nakahara, K., Deshpande, S., Ortiz-Monasterio, I., Ishitani, M., 2017. Genetic mitigation strategies to tackle agricultural GHG emissions: The case for biological nitrification inhibition technology. Plant Science 262, 165–168.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Hurtado, M. del P., Ono, H., Moreta, D.E., Salcedo, A.F., Yoshihashi, A.T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. Proceedings of the National Academy of Sciences pnas-0903694106.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y., Zakir, H., Deshpande, S.P., Hash, C.T., 2013a. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. Plant and soil 366, 243–259.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., Zhu, Y., Zakir, H., Deshpande, S.P., Hash, C.T., 2013b. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. Plant and soil 366, 243–259.
- Subbarao, G.V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Yoshihashi, T., Ito, O., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Kawano, N., Berry, W.L., 2008. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification. Plant and soil 313, 89–99.

- Subbarao, G.V., Rondon, M., Ito, O., Ishikawa, T., Rao, I.M., Nakahara, K., Lascano, C., Berry, W.L., 2007. Biological nitrification inhibition (BNI)—is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294, 5–18.
- Subbarao, G.V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K.L., Rao, I.M., Lata, J.-C., Kishii, M., Braun, H.-J., 2015. Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science* 233, 155–164.
- Sun, R., Guo, X., Wang, D., Chu, H., 2015. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle. *Applied Soil Ecology* 95, 171–178.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54, 733–749.
- Thompson, D., Pizzi, A., 1995. Simple ¹³C-NMR methods for quantitative determinations of polyflavonoid tannin characteristics. *Journal of applied polymer science* 55, 107–112.
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., Hallin, S., 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS microbiology ecology* 49, 401–417.
- Tian, S., Lu, L., Xie, R., Zhang, M., Jernstedt, J., Hou, D., Ramsier, C., Brown, P., 2015. Supplemental macronutrients and microbial fermentation products improve the uptake and transport of foliar applied zinc in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Studies utilizing micro X-ray fluorescence. *Frontiers in plant science* 5, 808.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671.
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment* 23, 1005–1024.
- Tong, H., Chen, W., Merritt, J., Qi, F., Shi, W., Dong, X., 2007. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Molecular microbiology* 63, 872–880.
- Traon, D., Amat, L., Zott, F., du Jardin, P., 2014. A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU-Report to the European Commission, DG Enterprise & Industry.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 6347–6353.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënné-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science* 4, 356.
- Van Der Heijden, M.G., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters* 11, 296–310.
- Van Der Krift, T.A., Berendse, F., 2001. The effect of plant species on soil nitrogen mineralization. *Journal of Ecology* 89, 555–561.
- Van der Salm, C., Dolfing, J., Heinen, M., Velthof, G.L., 2007. Estimation of nitrogen losses via denitrification from a heavy clay soil under grass. *Agriculture, ecosystems & environment* 119, 311–319.

- Van Velzen, A.G., Sips, A.J., Schothorst, R.C., Lambers, A.C., Meulenbelt, J., 2008. The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. *Toxicology letters* 181, 177–181.
- Venter, P.B., Sisa, M., van der Merwe, M.J., Bonnet, S.L., van der Westhuizen, J.H., 2012. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 1: The chemical composition of quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. *Phytochemistry* 73, 95–105.
- Vernieri, P., Malorgio, F., Tognoni, F. (Pisa U. (Italy) D. di B. delle P.A., 2002. [Use of biostimulants in production of vegetable seedlings]. *Colture Protette* (Italy).
- Vivas, N., Nonier, M.-F., de Gaulejac, N.V., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M., 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513, 247–256.
- Wallenstein, M.D., Myrold, D.D., Firestone, M., Voytek, M., 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological applications* 16, 2143–2152.
- Wang, D., Griffiths, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., Bisseling, T., Long, S., 2010. A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* 327, 1126–1129.
- Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G., 2011. *Nitrification*. American Society for Microbiology Press.
- Ward, M.H., DeKok, T.M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B.T., VanDerslice, J., 2005. Workgroup report: drinking-water nitrate and health—recent findings and research needs. *Environmental health perspectives* 113, 1607–1614.
- Wedin, D.A., Tilman, D., 1990. Species effects on nitrogen cycling: a test with perennial grasses. *Oecologia* 84, 433–441.
- Weiske, A., Benckiser, G., Herbert, T., Ottow, J., 2001. Influence of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils* 34, 109–117.
- West, T.O., Post, W.M., 2002. Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation. *Soil Science Society of America Journal* 66, 1930–1946.
- Wett, B., Rauch, W., 2003. The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater. *Water research* 37, 1100–1110.
- Wick, K., Heumesser, C., Schmid, E., 2012. Groundwater nitrate contamination: factors and indicators. *Journal of Environmental Management* 111, 178–186.
- Winiwarter, W., Klimont, Z., 2011. The role of N-gases (N₂O, NO_x, NH₃) in cost-effective strategies to reduce greenhouse gas emissions and air pollution in Europe. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3, 438–445.
- Wright, R.O., Lewander, W.J., Woolf, A.D., 1999. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Annals of emergency medicine* 34, 646–656.
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B., 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences* 11, 622–646.
- Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H., 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science* 7, 2049.

- Yang, X., Wu, X., Hao, H., He, Z., 2008. Mechanisms and assessment of water eutrophication. *Journal of Zhejiang University Science B* 9, 197–209.
- Yapa, L., 1993. What are improved seeds? An epistemology of the Green Revolution. *Economic geography* 69, 254–273.
- Zaman, M., Di, H.J., Cameron, K.C., Frampton, C.M., 1999. Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials. *Biology and Fertility of Soils* 29, 178–186. <https://doi.org/10.1007/s003740050542>
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler von Locquenghien, K., Pasda, G., Rädle, M., Wissemeier, A., 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and Fertility of Soils* 34, 79–84. <https://doi.org/10.1007/s003740100380>
- Zhou, K., Raffoul, J.J., 2012. Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of oncology* 2012.
- Zodape, S.T., Gupta, A., Bhandari, S.C., Rawat, U.S., Chaudhary, D.R., Eswaran, K., Chikara, J., 2011. Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *JSIR* Vol.70(03) [March 2011].
- Zou, T., Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S., Gu, L., 2012. Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. *Food hydrocolloids* 27, 293–300.
- Zumft, W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 533–616.

