

**Rapport technique final du projet INTRANT  
05.12.2025**

**Mario Fontana (Agroscope), Luca Bragazza  
(Agroscope), Ophélie Sauzet (HEPIA)**

**Soutien du FOBO-CH**

## 1. Abstracts

Ce projet vise à valoriser des résidus ligneux forestiers en développant une méthode pour stocker du carbone, restaurer la fertilité de sols agricoles et lutter contre les plantes adventices. Les résidus ligneux incorporés et/ou épandus sur un essai en plein champ a permis d'observer la réponse sur les sols deux grandes cultures successives (colza et blé). L'influence multifactorielle de ces traitements sur les sols, les cultures et les mauvaises herbes a été étudiée.

*Questo progetto mira a valorizzare i residui legnosi forestali sviluppando un metodo per immagazzinare il carbonio, ripristinare la fertilità dei terreni agricoli e combattere le piante infestanti. I residui legnosi incorporati e/o sparsi su un campo di prova hanno permesso di osservare la risposta dei terreni a due grandi colture successive (colza e grano). È stata studiata l'influenza multifattoriale di questi trattamenti sulla fertilità chimica, fisica e biologica del suolo, sulle colture e sulle erbe infestanti.*

## 2. Résumé

Cette étude explore l'impact d'un amendement massif de résidus ligneux (écorce de sapin blanc et refus de compostage) sur la fertilité des sols agricoles et le développement des plantes adventices. Ces matériaux, caractérisés par un rapport C/N élevé ( $\approx 65-80$ ) et des composés allélopathiques, ont été appliqués à raison de  $300 \text{ m}^3/\text{ha}$ , soit incorporés à 10 cm, soit en mulch. Les effets ont été évalués sur le carbone organique du sol (SOC), la qualité biologique, la dynamique de l'azote, la nutrition, la performance des cultures et les plantes adventices.

Les résultats montrent :

- Une augmentation du SOC principalement la première année.
- Influence négligeable sur la qualité de la matière organique du sol
- Une amélioration de la qualité biologique du sol (Cmic/SOC) à moyen terme via les résidus ligneux et une modification des niches microbiologiques.
- Une diminution de la densité apparente en cas d'incorporation des résidus grâce à une augmentation de la porosité structurale (qui accueille la vie et stocke l'eau facilement disponible pour les cultures).
- Une faim d'azote temporaire, plus marquée en cas d'incorporation mais plus longue pour le mulch, atténuée par la fertilisation azotée.
- Influence négligeable sur les autres macronutriments du sol
- Un impact limité sur les cultures : non significatif ( $p < 0.05$ ) sur la nutrition des cultures, légère baisse de la production de biomasse aérienne du colza (culture suivant l'amendement) compensée par la fertilisation, pas d'effet sur les rendements en grain et aucune incidence sur la qualité des grains.
- Un effet allélopathique des résidus ligneux pas suffisant pour contrôler les adventices et se substituer aux herbicides. Néanmoins le mulch est une méthode prometteuse pour être utilisée en combinaison avec d'autres méthodes (p.ex. sarclage)

En conclusion, l'apport massif de résidus ligneux améliore la teneur en matière organique (+0,7 %) et la qualité biologique du sol. L'incorporation est avantageuse comparativement au mulch pour augmenter la matière organique du sol et permet également de réduire la densité apparente du sol. Bien que des carences en azote puissent survenir, elles sont gérables via la fertilisation. Cette pratique constitue une stratégie prometteuse pour renforcer la durabilité des systèmes de grandes cultures.

*Questo studio esplora l'impatto di un apporto di residui legnosi (corteccia di abete bianco e scarti di compostaggio) sulla fertilità dei terreni agricoli e sullo sviluppo delle piante infestanti. I due substrati legnosi utilizzati, caratterizzati da un elevato rapporto C/N ( $\approx 65-80$ ) e da composti allelopatici, sono stati applicati in ragione di  $300 \text{ m}^3/\text{ha}$ , incorporati a 10 cm di profondità o utilizzati come pacciamatura. Gli effetti sono stati valutati sul carbonio organico del suolo (SOC), sulla qualità biologica, sulla dinamica dell'azoto, sulla nutrizione, sulla resa delle colture e sulla distribuzione delle piante infestanti.*

*I risultati dopo due anni dall'apporto evidenziano:*

- *Un aumento del SOC principalmente nel primo anno.*
- *Influenza trascurabile sulla qualità della materia organica del suolo.*
- *Un miglioramento della qualità biologica del suolo (Cmic/SOC) a medio termine attraverso i residui legnosi e una modifica delle nicchie microbiologiche.*

- *Una diminuzione della densità apparente in caso di incorporazione dei residui grazie ad un aumento della porosità strutturale (che ospita la vita e immagazzina l'acqua facilmente disponibile per le colture).*
- *Una carenza temporanea di azoto, più marcata in caso di incorporazione ma più lunga per il pacciamame, attenuata dalla fertilizzazione azotata.*
- *Influenza trascurabile sugli altri macronutrienti del suolo.*
- *Impatto limitato sulla crescita delle colture: non significativo ( $p < 0,05$ ) sulla nutrizione delle colture, leggero calo della produzione di biomassa aerea della colza (coltura successiva all'emendamento) compensato dalla fertilizzazione, nessun effetto sulle rese in granella del frumento e nessuna incidenza sulla qualità proteica dei grani.*
- *Effetto allelopatico dei residui legnosi insufficiente per controllare le infestanti e sostituire completamente l'impiego di erbicidi. Tuttavia, il pacciamame è un metodo promettente da utilizzare in combinazione con altri metodi (ad esempio il diserbo).*

*In conclusione, l'apporto massiccio di residui legnosi migliora il contenuto di materia organica (+0,7%) e la qualità biologica del suolo. L'incorporazione è vantaggiosa rispetto alla pacciamatura per aumentare la materia organica del suolo e per consentire di ridurre la densità apparente del suolo. Sebbene possano verificarsi carenze di azoto, queste sono gestibili tramite la fertilizzazione. In conclusione, l'impiego dei due prodotti legnosi costituisce una strategia promettente per rafforzare la sostenibilità dei sistemi di coltivazione estensiva.*

### 3. Situation de départ

Augmenter la teneur en matière organique des sols agricoles constitue une priorité pour la Suisse comme pour ses cantons, par exemple le canton de Vaud (OFEV; Rapport du Conseil fédéral, 2017; État de Vaud) où le déficit carbone organique ( $C_{org}$ ) des sols agricoles pour la couche 0-20 cm est estimé à 2'000'000 de tonnes (Dupla et al. 2021). Cette volonté s'inscrit dans le cadre de l'initiative internationale "4 pour 1000", visant à augmenter la teneur en matière organique des sols et à montrer que les sols agricoles peuvent jouer un rôle crucial pour la sécurité alimentaire et le changement climatique.

L'amendement de matière organique est un levier majeur pour augmenter la teneur en matière organique dans les sols agricoles (Dupla et al. 2022). Le bois raméal fragmenté peut être un amendement efficace à la fois pour augmenter la matière organique mais également pour améliorer la fertilité des sols (N'dayegamiye and Angers 1993; Gasser et al. 1995; Arminjon 2020; Fontana et al. 2023). En revanche, l'utilisation de matières ligneuses avec des ratios C/N plus élevés et/ou du carbone récalcitrant (i.e., difficilement décomposable par les microorganismes) est beaucoup plus controversée et son effet sur les sols est mal connu. En Suisse, la disponibilité du bois raméal fragmenté est limitante pour une utilisation en grande culture tandis que certains résidus ligneux issus de l'industrie pourraient être revalorisés en agriculture si leur utilisation permettait d'améliorer les propriétés des sols à long terme sans affecter négativement les performances des cultures à court terme.

La scierie de La Rippe génère des écorces de sapin blanc, une matière ligneuse fraîche susceptible de contenir des composés allélopathiques. Aussi, la compostière du Gros-de-Vaud produit du refus de compostage constitué de matière ligneuse récalcitrante (cad difficile à décomposer par les microorganismes) à la fin de chaque cycle de compostage. Bien que l'écorce de sapin blanc et les résidus ligneux soient de qualité très contrastée, leur ratio C/N est très élevé, ils ne sont pas valorisés par les industries qui les génèrent et représentent une contrainte.

#### 4. Objectifs

Ce projet vise à utiliser ces résidus ligneux pour tester la possibilité de restaurer un sol (augmentation du carbone et de la fertilité à long terme) et de lutter contre les adventices afin de développer une pratique agricole durable et résiliente basée sur une synergie entre les secteurs agricole et forestier. Plus précisément, le projet comporte les objectifs suivants visant à quantifier:

1. l'effet d'un amendement en mulch et/ou en incorporation
2. avec deux types de résidus ligneux contrastés sur
  - a. le stockage du C dans le sol (transfert des résidus ligneux jusqu'à la phase solide du sol)
  - b. la fertilité (aspects biologique, chimique et physique) du sol, le rendement et la nutrition des cultures (colza, engrais vert et blé)
3. le contrôle des plantes adventices

## 5. Questions de recherche

Différentes questions de recherches en lien avec les objectifs ont été traitées au sein de ce projet :

- **Est-ce qu'une dose massive d'un intrant ligneux de mauvaise qualité (C/N élevés et composés allélopathiques) peut être apportée au sol pour faire augmenter la teneur en matière organique sans péjorer les performances des cultures sur le court terme**  
→ Les intrants ligneux peuvent augmenter la matière organique du sol mais lorsque ceux-ci sont récalcitrants (cad faiblement décomposable par les microorganismes), le transfert du carbone vers le sol a été rarement quantifié. Aussi, les intrants ligneux peuvent induire une faim en azote, de surcroît avec un C/N élevé. Il est donc pertinent de tester les limites et de voir dans quelle mesure un amendement massif peut être toléré par les cultures subséquentement établies et dans quelle mesure la nutrition des cultures est affectée.
  
- **Quel effet sur le carbone du sol et les performances des cultures selon le type de résidu utilisé comme amendement ?**  
→ Répondre à cette question permettrait de savoir dans quelle mesure les sous-produits forestiers pourrait être utilisé quel que soit sa qualité et ses spécificités (provenance, organe de l'arbre, essence d'arbre, etc)
  
- **Quelle différence sur le carbone du sol et les performances des cultures si les résidus sont incorporés ou laissés en mulch ?**  
→ L'usage de bois raméal fragmenté et autres intrants ligneux dans l'agriculture est de plus en plus courant et préconisé, néanmoins l'effet du mode d'épandage (mulch ou incorporation) est mal connu et très peu d'étude scientifiques ont été réalisées sur le sujet
  
- **Peut-on contrôler les plantes adventices à l'aide de principes actifs allélopathiques supposément contenus dans les résidus ligneux et/ou grâce à un épandage en mulch ?**  
→ L'usage des produits phytosanitaires en agriculture est problématique et des alternatives doivent être développées. L'usage de résidus ligneux pour contrôler le développement des adventices serait une alternative idéale dans le cas de résultats concluants.

## 6. Méthodes

### *Description de l'essai*

#### La parcelle et les placettes expérimentales

Ce projet est réalisé à travers une expérimentation en plein champs pour être au plus proche de la réalité agricole. La parcelle située dans la station de recherche Agroscope Changins (Fig. 1) a été cultivée de façon conventionnelle depuis plusieurs décennies. Le sol argilo-calcaire (pH 6.8) a une teneur de  $C_{org}$  très basse (2.9%) au regard de la teneur en argile assez élevée (48%). Le ratio carbone/argile très bas (6%) indique une mauvaise qualité structurale.



**Figure 1.** Parcelle (en rouge) mise à disposition par la station de recherche Agroscope Changins (coordonnées GPS: 46°23'55.72"/ 06°14'24.72").

Le design et les dimensions de l'essai ont été élaborés pour obtenir des résultats représentatifs des conditions agricoles suisses. Les 4 placettes (8 x 8 m) établies pour chacune des 2 modalités d'épandage et chacun des 2 types de résidus correspondent à 16 placettes, auxquelles il faut ajouter les 4 placettes de contrôle pour un total de 20 placettes expérimentales.

#### Résidus ligneux

Les deux types de résidus ligneux ont été choisis pour leur qualité contrastée. Comme l'effet d'un apport de résidus ligneux diffère selon les essences dont ils proviennent et selon leur état de décomposition:

- les résidus de scierie, constitués d'écorce de conifère, sont « frais » (Figure 2A).
- les résidus de compostière sont générés lors du tamisage final du compost mature (Figure 2B). Le refus de tamisage est la fraction la plus grossière qui ne peut pas être intégrée au compost commercialisé. Il contient des résidus de bois mesurant plusieurs cm qui proviennent de feuillus et de conifères.

Une analyse chimique des deux types de résidus ligneux a été faite pour quantifier leur teneur en C et en nutriments.



**Figure 2A.** Résidus de la scierie de la Rippe.



**Figure 2B.** Résidus ligneux de compostière du Gros-de-Vaud.

### Modalités pour l'amendement

L'effet d'un amendement ( $300 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) de chaque résidu ligneux est étudié sur 2 cultures successives: colza (1<sup>ère</sup> culture) et blé d'automne (2<sup>ème</sup> culture) avec un engrais vert entre les deux cultures. L'amendement des résidus ligneux a été effectué en août 2022 selon 2 modalités: i) mulch et ii) incorporé.

- Mulch (Figure 3A): l'épandage a été réalisé sur les placettes concernées la veille du semis de colza.
- Incorporation (Figure 3B): après épandage ( $300 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ), les résidus ligneux ont été incorporés dans la couche 0-10 cm à l'aide d'un rototiller (travail superficiel du sol) avant le semis de colza.
- Traitement contrôle (Figure 3 C): aucun résidu ligneux ni aucun herbicide n'a été épandu. De plus, un anti dicotylédone en prélevée et un anti-graminée en post-levée ont été appliqués sur des parcelles attenantes à l'essai où la même rotation de culture est suivie, ainsi des analyses ont également été effectuées sur le contrôle négatif (inclus dans l'essai) et un contrôle positif (nommé « Herbicide » faisant référence aux parcelles attenantes).



**Figure 3A.** Refus de compostage en mulch.



**Figure 3B.** Refus de compostage incorporé.



**Figure 3C.** Contrôle.

Afin de conserver le mulch, la destruction de l'engrais vert a été effectuée à l'aide de glyphosate. Les semis d'engrais vert et de blé ont été effectués en semis direct.

### Quantité de résidu ligneux à amender

Un pré-test en serre a été effectué en juin 2022 avant la mise en place des cultures en plein champs pour déterminer la quantité optimale de résidus ligneux à amender (incorporés ou épandus en mulch) et pour tester l'effet des résidus ligneux sur la germination du colza et du blé (annexe). La quantité de résidus ligneux à amender a été fixée à  $300 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  ce qui correspond à la dose maximale recommandée pour un amendement en BRF (Gilli 2012) et à épaisseur de mulch suffisante (3 cm) pour espérer un effet physique capable de gêner la levée des adventices (Putnam and DeFrank 1983).

### Les semis

Le semis de colza a été réalisé avec un semoir combiné à un strip-tiller. Le strip-tiller est équipé de dents espacées de 60 cm qui travaillent le sol sous chaque rang de colza semé et d'un dispositif de roues crantées et de roues de rappui qui éloignent les résidus ligneux tandis que l'inter-rang est laissé intact.

Les semis de blé d'automne et d'engrais vert ont été réalisés avec un semoir permettant le semis direct. Le sorgho a été semé avec un semoir mono-graine après un travail superficiel du sol.

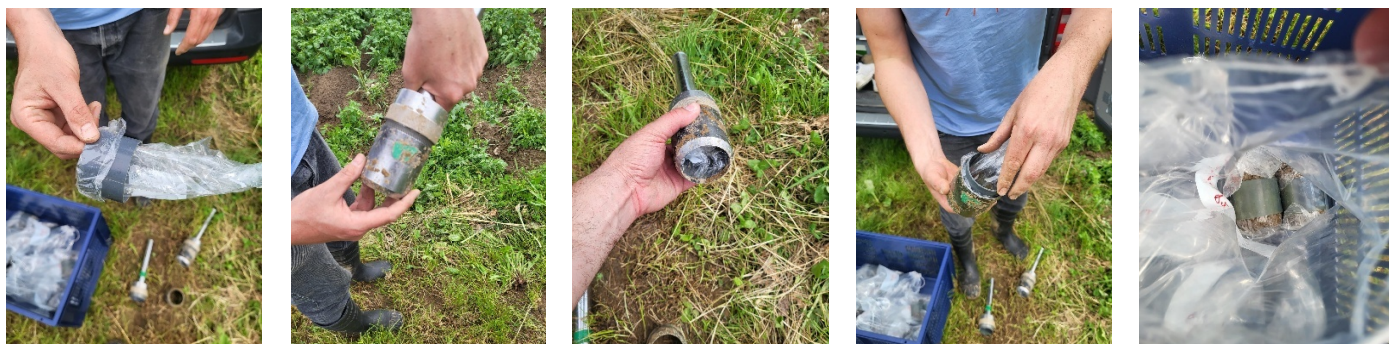
### *Échantillonnages*

#### Le sol

Pour mesurer le  $C_{mic}$ , le  $N_{mic}$ , le  $N_{min}$  ( $NH_4^+$  et  $NO_3^-$ ) et la fonctionnalité microbologique (plaque biolog, simplement en 2024), des échantillons de sol frais ont été collectés sur chacune des placettes avant l'amendement ( $T_0$ ), aux printemps 2023 (croissance du colza) et 2024 (croissance du blé). Une tarière manuelle a été utilisée pour réaliser 4 piqûres dans chacun des coins des placettes afin de prélever du sol à une profondeur de 10 cm. Les sols ont été mis dans des sachets. Les agrégats de sol dans le sachet ont été cassés à la main (cad sans contact direct entre la peau et le sol) puis déposé dans une glacière contenant des éléments de froids avant d'être stockés en chambre froide.

Pour mesurer les propriétés chimiques du sol avant l'épandage (à  $T_0$ ), après les récoltes de colza (juillet 2023) et de blé (juillet 2024), 4 piqûres ont été réalisées à la tarière manuelle à une profondeur de 10 cm dans chacun des coins des placettes pour collecter des échantillons composites dans des sachets. Les sols ont été laissés séchés à l'air puis tamisés à 2 mm et enfin conditionnés dans des bocaux étiquetés pour être envoyé pour analyse.

Pour mesurer les propriétés physiques du sol, des échantillons non remaniés ont été collectés à une profondeur de 3-8 cm à l'aide d'un préleveur spécialement dimensionné (Figure 4). À 3 coins de chaque placette, les 3 premiers cm de sols ont été décapés à la bêche afin de collecter 2 échantillons non remaniés à l'aide de 2 préleveurs. Sur chacune des placettes, 6 échantillons ont été collectés bien que le retrait d'uniquement 3 échantillons aient été analysés, les 3 échantillons supplémentaires ont été collectés par sécurité, sachant que les échantillons sont fragiles et peuvent être abimés durant leur manipulation et leur transport. Les préleveurs ont été enfoncés dans le sol à l'aide d'un maillet. Les préleveurs ont été sortis du sol qu'après que les 2 aient été enfoncés pour éviter de déstructurer (p.ex. fissurer) le sol dans la zone d'échantillonnage. Les échantillons ont été ensuite délicatement placés dans une caisse en plastique puis stocké en chambre froide avant analyse.



**Figure 4.** Préleveur pour collecter les échantillons non remaniés

### La biomasse

La biomasse aérienne du colza et du blé ont été collectées en stade de croissance végétative sur un mètre linéaire sur chacune des placettes en coupant les plantes au niveau du collet. La biomasse a ensuite été immédiatement pesée au champ. Ensuite, un sous-échantillon (pour le colza) ou la totalité de la biomasse (pour le blé) ont été séchés à l'étuve (45 °c pendant 48 heures). La biomasse a été étalée au maximum pour éviter le développement des moisissures dans l'étuve qui peut advenir lorsque les échantillons de biomasse sont trop importants et pas suffisamment dispersés, limitant ainsi le séchage de la biomasse. La biomasse sèche a ensuite été pesée pour estimer le taux d'humidité et déduire la production de biomasse sèche (avec un nombre de mètres linéaires par hectare connu). Enfin, la biomasse sèche a été broyée au moulin puis conditionnée dans des bocaux étiquetés avant d'être envoyé pour analyse.

Pour estimer la production de biomasse d'engrais vert sur chaque placette, 3 plantes vigoureuses de tournesol, de niger et féverole ont été collectées fraîches puis pesées avant et après avoir été séchées (45 °C pendant 48 heures).

### Le grain

Une batteuse expérimentale avec pesée embarquée a été utilisée pour estimer le rendement en grain de chacune des placette expérimentales (8m × 8m). Lors de la culture de colza, de nombreuses adventices ont gêné le développement du colza de façon très hétérogène selon les zones du champ et à l'intérieur des placettes. Aussi, des dégâts probablement occasionnés des animaux ont été constatés. Aussi, le parcours de la batteuse a été préalablement déterminé et le nombre de mètres de rangs manquants ont été mesuré et comptabilisés afin d'effectuer une correction in fine. Pour chaque placette, un sous-échantillon de grain a été collecté dans la batteuse expérimentale. Le grain a ensuite été pesé avant et après séchage à l'étuve (45 °c pendant 48 heures) afin de déterminer la teneur en humidité. Enfin, le grain a été broyé au moulin puis conditionné dans des bocaux étiquetés avant d'être envoyé pour analyse.

### *Les résidus ligneux: perte en masse*

Environ 20 g de résidus (pesés très précisément) ont été mis dans des sacs de nylon puis scellés (Figure 5). Les sacs de nylon ont été ensuite mis au champ dans chacune des placettes ayant été amendée avec des résidus. Dans chaque placette, 3 sacs de nylon ont été mis à incuber. Les sacs de nylon ont été incorporés dans le sol des placettes dont l'amendement en résidu a été incorporé tandis que dans les placettes où les résidus ont été apportés sous forme de mulch, les sacs de nylon ont été laissés en surface et fixé avec un clou. Un piquet en plastique bleu (Figure 5) a permis d'identifier l'emplacement des sacs de nylon. Avant et après chaque passage de tracteur, les sacs de nylon et les piquets ont été enlevés puis remis. Pour chacune des placettes, un sac de nylon a été récupéré 3 mois, 1 an et 2 ans après l'amendement. Les sacs ont été nettoyé à la main pour enlever la terre avant de les ouvrir. Ensuite, le contenu a été séché à l'étuve (45 °c pendant 48 heures) puis pesé afin de déduire la perte en masse par rapport à la masse initiale.



**Figure 5.** Sacs de nylon remplis de résidus ligneux et incorporé dans le sol ou laissés à la surface du sol.

### *Courbe de retrait*

Début juillet 2024, 3 échantillons non remaniés (avec un réplica pour chaque échantillon prélevé) ont été prélevés entre 3 et 8 cm de profondeur pour chaque placette afin d'analyser les propriétés physiques du sol. Chaque échantillon a été mis à l'équilibre à un potentiel matriciel de  $-10$  hPa dans un bac à succion à HEPIA après avoir été retiré du cylindre en PVC pour permettre un gonflement libre. Après l'équilibrage, l'échantillon a été pesé, et son volume déterminé avec un scanner 3D à lumière structurée (scanner EinScanSP de SHINING 3D). Les échantillons ont ensuite été placés dans l'appareil de retrait décrit dans Boivin et al. (2004). Les variations continues de la hauteur du sol (transducteur de déplacement linéaire), de la masse (balance) et du potentiel matriciel (tensiomètre de 2 mm de diamètre) ont été enregistrées toutes les 5 minutes jusqu'à ce que la hauteur et le poids restent constants. Les variations de la teneur en eau gravimétrique ont été calculées à l'aide du poids enregistré lors de l'analyse et du poids de l'échantillon séché au four à  $105$  °C, après avoir retiré la masse sèche de la fraction grossière ( $> 2$  mm). Le volume des échantillons a été mesuré une seconde fois avec le scanner à l'état séché à l'air et les variations de hauteur ont été converties en variations de volume après avoir retiré le volume de la fraction grossière comme décrit par Schäffer et al. (2008). Certaines propriétés physiques sont mesurées directement sur la courbe de retrait, à savoir le volume spécifique du sol et la teneur en eau gravimétrique, qui peuvent être référées à un potentiel matriciel en utilisant la lecture du tensiomètre, ou à l'état sec à l'air. La teneur en air gravimétrique du sol peut être calculée à partir de ces valeurs en soustrayant la teneur en eau gravimétrique et le volume spécifique de la phase solide au volume spécifique du sol, en tenant compte de la densité des particules, moyenne à  $1/2,65$   $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$  dans ce travail. Les propriétés correspondantes ont été notées V, W et A pour le volume spécifique, la teneur en eau gravimétrique et la teneur en air gravimétrique, respectivement, avec le potentiel matriciel ou « sec » (pour sec à l'air) en indice. Des propriétés supplémentaires ont été déterminées en modélisant la ShC avec le modèle XP (Braudeau et al. 1999), ce qui a permis de quantifier séparément les volumes spécifiques des porosités structurales et plasmiques et leurs contenus en air et en eau à n'importe quelle valeur de W (Schäffer et al. 2008). Nous avons utilisé les procédures décrites par exemple dans Johannes et al. (2019) et Schäffer et al. (2008) pour la modélisation.

### *Texture et carbone organique des échantillons non remaniés*

Début juillet 2024, 3 échantillons non remaniés ont été prélevés pour chaque placette à une profondeur comprise entre 3 et 8 cm. Après mesure du retrait, les échantillons ont été séchés à  $105$  degrés. La texture (5 classes) a été déterminée sur la fraction  $< 2$  mm en utilisant la méthode standard de sédimentation par pipette de Robinson (ISO 11277). Le carbone organique a été analysé sur la terre

fine de chacun des échantillons (dans la fraction < 2 mm) à l'aide de la méthode de Walkley et Black (1934).

#### *Analyse de l'activité lombricienne*

Pour mettre en évidence le rôle des vers de terre dans i) l'incorporation des résidus et ii) la dynamique de structuration associée, l'activité lombricienne a été quantifiée par des prélèvements de turricules de surface le 01-02.05.2023, le 30.04 et 01.05.2024, ainsi que le 18-19.06.2024, sur les 20 placettes du dispositif. 4 quadrats de 0.25 m<sup>2</sup> par placette ont été analysés selon les paramètres suivants : nombre, poids frais et poids sec à l'air des turricules. Les conditions d'humidité du sol lors des différents prélèvements ainsi que les données météorologiques sont présentées en annexes.

#### *Analyse des stocks de carbone*

Début juillet 2024, quatre piqures à 30 cm de profondeur ont été effectuées à l'aide d'une gouge de 58.46 cm<sup>3</sup> pour chaque placette afin de déterminer le stock de C de la terre fine des modalités. Au sein de chaque placette, un mini profil de 30 cm de profondeur a été également creusé temporairement afin d'estimer la proportion d'éléments minéraux grossiers de chaque placette car ces derniers ne doivent pas être comptabilisés comme terre fine lors des calculs de stocks de C.

#### *Matière organique particulaire (POM)*

La matière organique particulaire issue des échantillons de sol collectés pour analyser les propriétés chimiques a été séparée par flottaison. Entre 50 g et 150 g de sol ont été incorporés dans un béccher rempli d'eau déminéralisée (densité 1 g cm<sup>-3</sup>). La matière particulaire en flottaison a été récupérée à l'aide d'une passoire de cuisine. La matière organique particulaire collectée a ensuite été transférée dans un godet. Le restant de sol a été transféré dans autre béccher contenant de l'eau concentrée en NaCl à la limite du coefficient de solubilisation (densité 1.19 g cm<sup>-3</sup>). La matière organique en flottaison a également été récupérée à l'aide d'une passoire. Les godets ont ensuite été mis à l'étuve (48 heures à 45 °c). Ensuite, la matière organique particulaire a été pesée et la concentration a été déduite en fonction de la masse de sol sec utilisée pour chaque échantillon.

#### *Analyses Rock-Eval©*

Quelques grammes des échantillons de sol composites collectés à T<sub>0</sub>, après les récoltes de colza (T<sub>1</sub>) et de blé (T<sub>2</sub>) pour l'analyse des propriétés chimiques (séché à l'air puis tamisé à 2 mm) ont été pulvérisés à la main (broyé finement dans un creuset à l'aide d'un mortier) pour l'analyse. En plus, des échantillons d'écorce de sapin blanc et de refus de compostage séchés à l'air ont été broyés finement à l'aide d'un moulin.

Les différentes fractions thermiques de la matière organique ont été analysés à l'aide d'un analyseur Rock-Eval® 6 de Vinci Technologies. Le lecteur peut se référer à Deluz et al. (2024), Behar et al. (2001), Disnar et al. (2003), et Lafargue et al. (1998) pour une description détaillée de la méthode et de son interprétation. La méthode RockEval consiste à exposer les échantillons de sol à différentes températures (combustion et pyrolyse) pour observer les signatures thermiques des différents composés organiques et en particulier les composés hydrocarbonés (HC). Ces signatures sont appelées

thermogrammes. Leur étude permet de calculer plusieurs indicateurs qui permettent de caractériser le carbone organique total (TOC) et les HC qui le composent. Le carbone organique total est l'ensemble des composés organiques issus de la combustion et de la pyrolyse. Le degré d'hydrogénation (HI) de la matière organique (MO) indique la proportion d'énergie potentiellement disponible pour les microorganismes et l'index d'oxygénation (OI) indique la proportion de la matière organique « usée » en termes d'énergie disponible. Le rapport entre les deux indices permet de caractériser l'état énergétique de la MO. Un HI élevé, indique une MO avec beaucoup d'énergie potentielle disponible pour les organismes du sol, tandis qu'un OI élevé indique une MO déjà dégradée. La température à laquelle le pic d'extraction des composés hydrocarbonés (HC) a été atteint renseigne sur le niveau de stabilité des hydrocarbures analysés. Plus la température est élevée, plus les HC sont considérés comme thermiquement stables, et inversement. L'indice I est un indice du degré de transformation de la MO immature (processus de décomposition). L'indice R est un indice de la contribution des HC réfractaires. Le rapport entre les deux indices permet de déterminer l'état de décomposition de la MO. Avec ces différents indicateurs, il est donc possible de déterminer si le sol contient plutôt de la MO thermiquement stable ou labile, ainsi que son état de décomposition et si elle est énergiquement riche ou oxydée.

#### *Analyse $N_{min}$ ( $NH_4^+$ et $NO_3^{2-}$ )*

Pour chacun des échantillons de sol frais, 20 g (1/- 0.05 g) a été pesé 2 fois (2 sous-réplicas) et mélangé avec 30 ml de KCl 1M dans un tube falcon (50 ml). Les tubes sont ensuite agités pendant 30 minutes puis laissé décanté pendant 30 minutes additionnelles. Le surnageant est filtré à la seringue (NB les premières gouttes sont jetées de façon à saturer le filtre de la seringue et ainsi éviter d'adsorber du  $NH_4^+$  ou du  $NO_3^{2-}$  de l'extrait collecté) de façon à disposer de quelques ml de l'extrait « clair ». Ensuite, des petits volumes (50  $\mu$ l pour le  $NO_3^{2-}$  ou 150  $\mu$ l pour le  $NH_4^+$ ) sont ajoutés dans des puits de plaques dans lesquels seront ensuite apportés des réactifs colorimétriques (voir protocole en annexe). 3 sous-réplicas par extrait sont réalisés, pour un total de 6 sous-réplicas par échantillon de sol frais. Les plaques sont ensuite incubées 1h à température ambiante puis et l'absorbance (à 540 nm pour le  $NO_3^{2-}$  ou à 650 nm pour le  $NH_4^+$ ) a été lue à l'aide d'un microplate reader.

En parallèle, 10-15 g de chaque échantillon de sol frais a été placé dans un godet, pesé avant et après mise à l'étuve (24 h à 105 °c) pour déterminer la teneur en eau.

Enfin, les teneurs en  $NH_4^+$  et  $NO_3^{2-}$  par gramme de sol sec ont été calculée à l'aide des droites de calibration réalisées sur chacune des plaques et de la teneur en eau de chaque échantillon.

Le  $NH_4^+$  et  $NO_3^{2-}$  de l'écorce de sapin blanc et du bois compostés ont également été mesurés de la même manière que le sol sur des échantillons secs broyés soit en l'état soit incubés durant 5 jours à température ambiante après avoir été humidifié.

#### *Analyse $C_{mic}$ et $N_{mic}$*

La biomasse microbienne du sol C a été estimée par extraction/fumigation au chloroforme (Vance et al. 1987). Le carbone total des échantillons fumigés et non fumigés ( ) a été déterminé à l'aide d'un analyseur automatique TOC/TN (analyseur Shimadzu TOC-V CPH + TNM-1) après extraction (1:10) avec du  $K_2SO_4$  0,5 M. Les valeurs de ont été estimées selon les coefficients  $K_c = 0,45$  et  $0,54$  pour le  $C_{mic}$  et le  $N_{mic}$ , respectivement (Joergensen and Mueller 1996; Jenkinson et al. 2004).

### *Biolog*

Le principe des plaques BioLOG est de laisser incuber un extrait de sol dans des puits contenant différents substrats qui colorent la solution en violet suite à leur dégradation. La lecture de l'intensité de la couleur après plusieurs jours d'incubation est proportionnelle l'activité microbienne permettant de dégrader le substrat en question.

10 g de sol frais ont été mélangés à 90 de solution de solution saline (0.85% NaCl) et brassés pendant 30 minutes (150 RPM) puis laissés sédimentés. Avec une micropipette, 200 µl de surnageant (≈1 cm de profondeur pour éviter de collecter des particules organiques en suspension) est prélevé puis ajouté à 19.8 ml de solution saline (0.85% NaCl), pour une dilution totale de  $10 \times 100 = 1000$  fois). Dans chaque puits (3 réplicas des 31 substrat + 3 blancs = 96 puits par plaque), 150 µl ont été mis à incubé durant une semaine. Des lectures au microplate reader à 590 nm ont été effectuées quotidiennement pour estimer la « valeur plateau » afin de sélectionner les mesures avec lesquelles les analyses statistiques seront effectuées. Lorsque la valeur plateau est atteinte, le calcul de l'indice de shannon (shannon index :  $H' = \sum P_i \ln(P_i)$  n'évolue plus. À chaque absorbance doit être déduite le blanc et la valeur de lecture initiale. La base de donnée associée à la valeur plateau comporte 20 plaques  $\times$  31 substrats  $\times$  3 réplicas = 1860 absorbances mesurées (par jour mesuré).

### *Les mycorhizes arbusculaires*

Pour chacune des placettes, des systèmes racinaires de 4 plants de blé ont été échantillonné à l'aide de pioche et bêche puis stocké dans des sachets plastiques en chambre froide (en conservant un peu de terre autour pour conserver les mycorhizes intactes). Les systèmes racinaires ont ensuite été soigneusement nettoyés à l'eau (trempage et douchette) moins de 24 h avant d'être amenés au labo (voir protocole détaillé en annexe). Les racines ont ensuite été coupées en sous-sections de 1 à 2 cm, de façon à former un échantillon composite pour chacune des placettes. Les racines ont ensuite été blanchies en les chauffant dans une solution contenant du KOH. Les racines ont ensuite été extraites et nettoyées avec de l'acide acétique avant d'être colorées en les chauffant au bain marie en présence d'une solution colorante (IDEAL). Ensuite, 12 sections de racines ont été disposées parallèlement sur une plaque de microscope. Une goutte de glycérol a été ajouté avant de déposer une lame pour fixer les racines colorées. Pour chacun des échantillons composites, 3 plaques ont été montées pour un total de 36 sections de racine. Un « scoring » (indice d'infection mycorhizienne) a été réalisé sur chacune des sections de racine à l'aide d'un microscope optique (pour un total de  $12 \times 3 \times 20 = 720$  scorings) selon une méthode développée par l'INRAE ([Procedures \(inrae.fr\)](http://Procedures.inrae.fr)).

### *Analyse des propriétés chimiques des sols*

Le carbone organique du sol a été mesuré après oxydation sulfochromique (NF ISO 14235). Le pH du sol a été mesuré en utilisant un rapport sol/eau de 1:5 (NF ISO 10390). Le K, Ca, et Mg total ont été analysés à l'aide d'un ICP-OES Thermo Radial ICAP 6000 Series (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, États-Unis) après extraction à l'acide fluoridrique. Le K, le Ca et le Mg échangeables ont été analysés par extraction à l'acétate d'ammonium (NFX 31-108) combinée à l'ICP-OES. L'azote total du

sol a été déterminé à l'aide d'un analyseur élémentaire (Thermo Scientific, FLASH 2000, États-Unis) par combustion à sec (NF ISO 13878).

Le P total a été analysé par extraction à l'acide fluorhydrique (40 %) et  $\text{HClO}_4$  (65 %), puis par une méthode colorimétrique au molybdate (Murphy and Riley 1962) (NFX 31-147). L'extraction au bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) a été utilisée pour déterminer le P disponible dans le sol (Olsen 1954), qui a ensuite été mesuré selon Murphy et Riley (1962) (NF ISO 11263). Le P soluble à l'eau (P- $\text{H}_2\text{O}$ ) a été extrait pendant 18 h à température ambiante à un ratio de 1:10 (soit 10 g de sol sec dans 100 ml d'eau). Après décantation, les extraits ont été filtrés à la seringue (les premières gouttes d'extrait nécessaires pour saturer le filtre ont été jetées). Deux répliques par échantillon ont été pesées et 3 puits par répliques ont été incubés dans des plaques pour une réaction colorimétrique au vert de malachite.

#### *Mesures du potentiel rédox du sol*

20 g de sol sec issue des échantillons de sol collectés pour analyser les propriétés physiques ont été ajoutés à 20 g d'eau ultra pure, secoué à la main puis laissé à l'équilibre pendant au moins une heure. Le potentiel rédox du sol a ensuite été mesuré dans la solution à l'aide d'une sonde combinée Ag/AgCl-KCl Hach instruments.

#### *Mesures écophysiologicalues*

Pour le colza, l'ensemble des mesures ont été réalisées 3 fois durant la saison de croissance : le 04/04/2023, le 19/04/2023 et le 04/05/2023. Le NDVI a été estimé en faisant la moyenne de 4 valeurs mesurées en traversant chaque placette (4 × 8 m = 32 m) avec un Greenseeker Trimble. Sur chaque placette, la hauteur de 4 plants vigoureux de colza ont été mesurées. La teneur en chlorophylle (Hansatech Cl01) de 3 feuilles matures et vigoureuses dans le 1/3 supérieur de la canopée de chaque plant a été mesurée (3 feuilles × 4 plants = 12 valeurs de chlorophylle par parcelle). Enfin, une feuille d'un plant vigoureux du 1/3 supérieur de la canopée a été mise dans le noir avec un cache prévu à cet effet pendant 30 minutes (cad « dark adapted »), puis des indicateurs de l'efficacité photosynthétique ( $F_v/F_m$ , PI et PABS) ont été mesurées à l'aide d'un LI-COR Li600.

Pour le blé, la hauteur et le diamètre de la tige de chaque plant de 1 m linéaire (2 × 50 cm) de blé par placette ont été mesurés (avant que la biomasse soit échantillonnée). La chlorophylle (Hansatech Cl01) a été mesurée sur 10 feuilles drapeau par placette qui ont ensuite été collectées. La surface des feuilles drapeaux a été mesurée à l'aide d'un planimètre. Après avoir été séchées à l'étuve (24 h à 105 °C), les feuilles drapeau ont été pesées et la surface spécifique ( $\text{cm}^2/\text{mg}$ ) a pu être calculée.

Pour le sorgho, la chlorophylle (Hansatech Cl01) et la conductances stomatiques (LI-COR Li600) ont été mesurées sur 10 feuilles par placettes.

#### *L'analyse des nutriments dans la biomasse et le grain*

La teneur en carbone total a été évaluée par calcination (480 °C pendant 5 h). L'azote total a été mesuré après combustion à l'aide de la méthode Dumas (Masson et al. 2010). Le P, K, Ca, Mg et Fe totaux ont été déterminés par ICP-AES radial (Varian Vista RL Simultaneous ou Varian 725 ES Simultaneous) après calcination (480 °C pendant 5 h) et solubilisation dans l'acide fluorhydrique (Masson et al. 2010). Les statuts nutritionnels NNI, PNI et KNI pour l'N, le P et le K des cultures ont été calculés avec des valeurs

de référence relatives à la production de biomasse (cad que l'effet de dilution des nutriments durant la croissance de la plante est pris en compte) à l'aide de courbes critiques de dilution (Lemaire et al. 1984). Les calculs de NNI, de PNI et de KNI pour le colza et pour le blé sont basés sur des courbes critiques publiées (Justes et al. 1994; Cadot et al. 2018; Fontana et al. 2021, 2022; Paut et al. 2025).

### *Analyse de la flore adventice*

Pour chacune des placettes, 4 quadrats (50 cm × 50 cm) ont été disposés aléatoirement. En automne 2022 (durant la culture de colza non traitée avec des herbicides), l'ensemble de la flore adventice présente dans les quadrats sous forme de plantule a été déterminée, recensée et comptée. Au printemps 2023, la même procédure a été réalisée. En plus, la biomasse aérienne des plantes adventices a été collectée et séparée entre les repousses de blé (issues de la culture de blé précédente) et les autres plantes adventices, de façon à le peser séparément après avoir été séchées à l'étuve (24 h à 105 °c).

### *Statistiques*

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du programme R. Les traitements ont été comparés 2 à 2 avec un test des moindres écarts au carré à l'aide de la fonction *pairw.anova* disponible dans le package *asbio*. Pour traiter les données du biologie, une analyse linéaire discriminante a été réalisée pour tester la possibilité de discriminer les différents traitements sur la base d'une combinaison linéaire impliquant les 31 substrats. L'analyse discriminante a été faite avec la fonction *lda* disponible dans le package *MASS*. Les propriétés physiques du sol mesurées sont influencées par la teneur en argile qui est hétérogène au sein de la parcelle. L'argile a donc été utilisée comme covariable pour s'affranchir de l'hétérogénéité de la parcelle pré-existante à l'essai. Une régression linéaire entre chaque propriété physique et la teneur en argile a été effectuée et les résidus de ces régressions de chaque traitement ont été comparés 2 à 2 avec un test des moindres écarts au carré.

## 7. Résultats

### Résidus ligneux

Les teneurs en carbone (C) et en nutriments sont plus importantes pour le refus de compostage que pour l'écorce (Tableau 1). Les ratios C/N de l'écorce est de 79 et celui du refus est de 68 ce qui est cohérent avec le fait que le processus de compostage soit connu pour diminuer le ratio C/N.

**Tableau 1.** Teneur en carbone (C) et en nutriments (extraits à l'eau régale) des résidus ligneux (écorce et refus) prélevés en aout 2022 (T<sub>0</sub>).

	C %	N %	P g kg <sup>-1</sup>	K g kg <sup>-1</sup>	Ca g kg <sup>-1</sup>	Mg g kg <sup>-1</sup>	S g kg <sup>-1</sup>	B mg kg <sup>-1</sup>
Ecorce	42.7	0.54	0.30	1.74	47.9	2.12	0.39	9.74
Refus	45.4	0.67	0.73	6.11	12.0	1.30	0.52	14.6

Les teneurs en N minéral sont à peu près similaires pour les 2 types de résidus (Tableau 2). L'incubation a fait drastiquement chuter les teneurs en N minéral, ce qui se produit probablement dans le sol rapidement après l'amendement. En faisant l'hypothèse que 1 m<sup>3</sup> de résidus équivaut à 200 kg de matière sèche, 1 kg d'N par m<sup>3</sup> de résidu serait apporté avec une concentration hypothétique de 0.5% d'N, pour seulement 2 g d'N minéral (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NO<sub>3</sub><sup>2-</sup> = biodisponible) pour une teneur de 10 mg N<sub>Min</sub> kg<sup>-1</sup> de sol. Un amendement de 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> correspondrait alors à 300 kg de N ha<sup>-1</sup> pour seulement 600 g ha<sup>-1</sup> d'N minéral. Ceci suggère que la décomposition des résidus ligneux induit une demande microbienne en N minéral susceptible d'immobiliser l'N au détriment des cultures.

**Tableau 2.** (mg kg<sup>-1</sup>) des résidus ligneux secs et incubés (humidifié) 5 jours à température ambiante

	NO <sub>3</sub>		NH <sub>4</sub>	
	Ecorce	Refus	Ecorce	Refus
Sec	0.73	0.76	12.9	14.4
Incubé	0.05	0.70	0.9	2.6

L'analyse Rock-Eval © est un indicateur de la qualité de la matière organique. Le carbone labile et les concentrations des composés hydrocarbonés, qui contiennent de l'énergie pour les microorganismes, sont plus élevées pour l'écorce de conifère que le bois composté (Tableau 3). En revanche, la concentration en composés oxygénés est plus importantes pour le bois composté ce qui met en évidence un stade de décomposition plus avancé que l'écorce de conifère.

**Tableau 3.** Analyses Rock-Eval© de l'écorce de conifère et de bois composté : composés organiques hydrocarbonés en deçà et au-dessus de 200°C, composés organiques oxygénés entre 200 et 400°C durant la pyrolyse, degré d'immaturation de la matière organique (Iindex), degré de stabilisation de la matière organique (Rindex), HI degré d'hydrogénation de la matière organique et OI degré d'oxygénation de la matière organique.

	Écorce	Bois composté
TOC %C organique g <sup>-1</sup>	41.9	38.9
mg HC g <sup>-1</sup> < 200°C (S1)	3.6	0.09
mg HC g <sup>-1</sup> > 200°C (S2)	165	149
mg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> > 200°C (S3 entre 200 et 400°C)	55.8	70.0
Degré d'immaturation de la matière organique (Iindex)	0.64	0.97
Degré de stabilisation de la matière organique (Rindex)	0.27	0.16
mg HC/g TOC (HI)	394	380
mg CO <sub>2</sub> /g TOC (OI)	122	167

Le suivi de la perte en masse des résidus ligneux dans des sacs en nylon indique que la majeure partie de la décomposition a eu lieu durant la première année qui a suivi l'épandage, tandis que la perte en masse durant la deuxième année était bien plus faible (Figure 6). De plus, l'influence du type de résidus ligneux sur la cinétique de décomposition était majeure comparativement au mode d'épandage (mulch vs incorporation) qui était presque insignifiant. Néanmoins, le fait que le suivi de la dynamique de décomposition des résidus ligneux ait été réalisé avec des sacs en nylon ne permettait pas (i) à la macrofaune d'accéder aux résidus et (ii) un contact entre le sol et les résidus ligneux ce qui a pu ralentir la vitesse de décomposition et ainsi induire une limitation du dispositif expérimental.

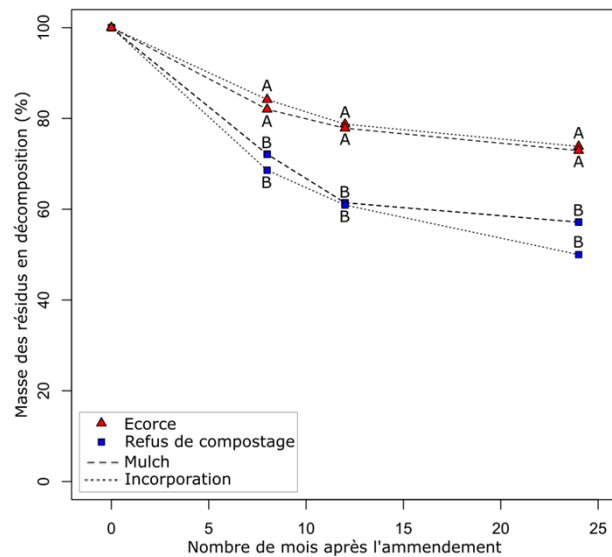


Figure 6. Perte en masse des résidus ligneux incubés dans des sacs de nylon

### Le carbone organique dans la terre fine

De façon cohérente avec les résultats obtenus à l'aide des sacs en nylon, l'augmentation du carbone organique dans la terre fine s'est produite principalement au cours de la première année suivant l'amendement (Figure 7). L'amendement des résidus a augmenté la teneur en carbone organique du sol de manière plus significative pour l'écorce que pour le bois composté.

Deux ans après l'amendement, le carbone organique de la terre fine a augmenté de 4 à 8 g par kg de sol, ce qui est une augmentation tout à fait considérable.

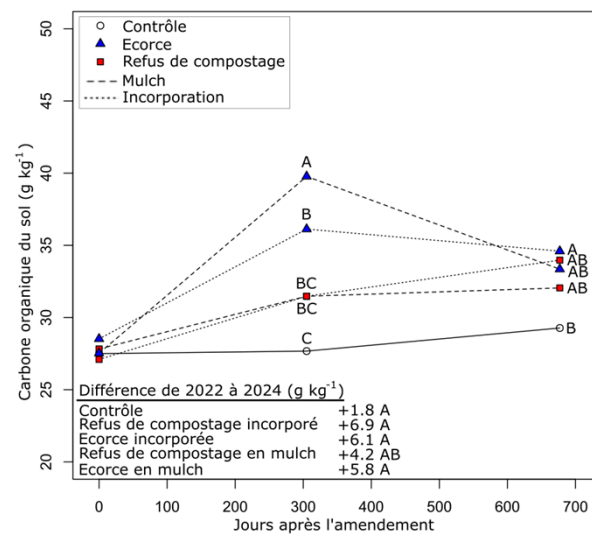


Figure 7. Évolution de la teneur en carbone organique dans la terre fine entre le début de l'essai (T<sub>0</sub>: août 2022) et le dernier prélèvement de sol (T<sub>2</sub>: juillet 2024). Les différences entre T<sub>0</sub> et T<sub>2</sub> sont également reportées pour chacun des traitements et comparées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

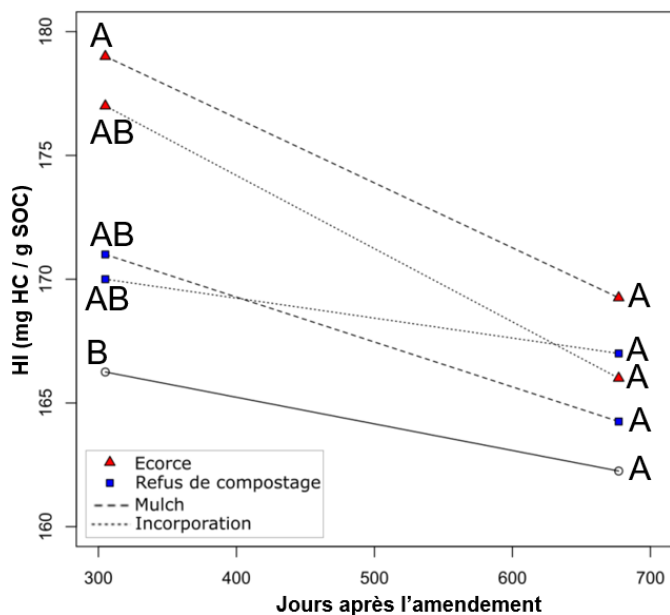
*L'analyse Rock-eval © de la terre fine*

L'analyse du sol Rock-eval © a révélé un changement significatif des composés hydrocarbonés dans la terre fine entre le contrôle et les autres traitements (Tableau 4) 10 mois après l'amendement, mais cet effet était très faible.

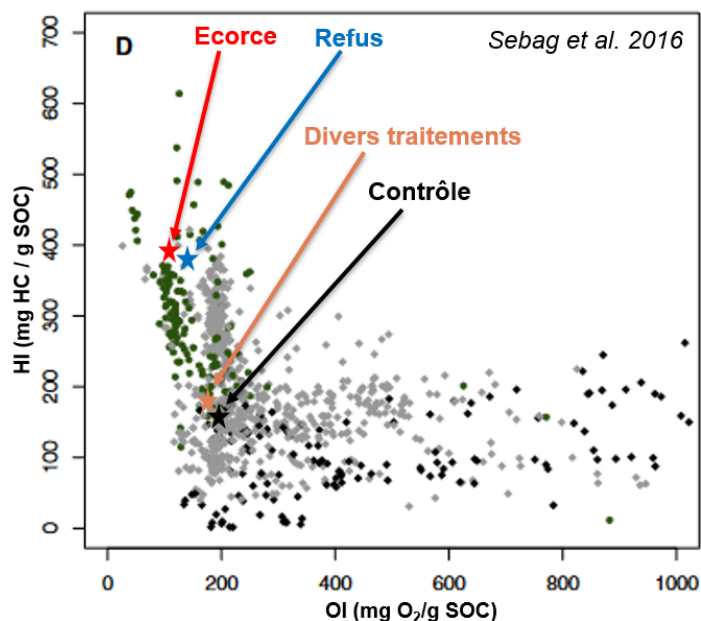
Tableau 4. Analyses Rock-Eval© de la terre fine : composés organiques hydrocarbonés HC en deçà et au-dessus de 200°C, composés organiques oxygénés entre 200 et 400°C durant la pyrolyse, carbone pyrolysé (PC), carbone résiduel (RC), degré de transformation de la MO immature (Iindex), indice de la contribution des pools les plus thermiquement réfractaires (Rindex), HI degré d'hydrogénation de la matière organique et OI degré d'oxygénation de la matière organique.

			Contrôle	Ecorce Incorporée	Ecorce Mulch	Refus Incorporée	Refus Mulch
S1	µgHC g <sup>-1</sup> en dessous de 200°C	Colza	18.3 A	12.1 B	11.2 B	10.8 B	13.0 B
		Blé	8.85 B	9.74 AB	9.32 AB	8.12 B	10.8 A
S2	mg HC g <sup>-1</sup> au- dessus de 200°C	Colza	4.17 B	5.89 A	5.98 A	4.76 B	5.06 AB
		Blé	4.16 B	5.15 A	5.25 A	4.70 AB	4.51 AB
S3	mg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> > 200°C (S3 entre 200 et 400°C)	Colza	6.41 B	7.86 A	7.90 A	6.92 AB	7.30 AB
		Blé	6.55 A	7.60 A	7.54 A	6.94 A	6.92 A
PC	mg C organique g <sup>-1</sup> pyrolysé	Colza	6.10 B	8.24 A	8.37 A	6.83 B	7.24 AB
		Blé	6.14 B	7.47 A	7.55 A	6.78 AB	6.59 AB
RC	mg C organique g <sup>-1</sup> oxydé	Colza	19.6 B	25.8 A	25.9 A	21.9 AB	23.2 AB
		Blé	20.0 A	24.2 A	24.2 A	22.0 A	21.5 A
Iindex		Colza	0.149 A	0.135 B	0.141 B	0.145 AB	0.142 AB
		Blé	0.129 A	0.118 AB	0.121 B	0.134 AB	0.122 AB
Rindex		Colza	0.597 A	0.604 A	0.599 A	0.597 A	0.602 A
		Blé	0.607 AB	0.614 A	0.614 A	0.602 B	0.612 AB
HI	mg HC/g TOC	Colza	166 B	177 AB	179 A	170 AB	171 AB
		Blé	162 A	166 A	169 A	167 A	164 A
OI	mg CO <sub>2</sub> /g TOC	Colza	199 A	186 B	189 B	195 A	192 AB
		Blé	205 A	196 A	197 A	198 A	202 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives (p < 0.05) entre les traitements.



**Figure 9.** Composés hydrocarbonés dans la terre fine des différents traitements après la culture de colza (T<sub>1</sub>) et de blé (T<sub>2</sub>). Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.



**Figure 10.** Composés hydrocarbonés en fonction des composés oxygénés (signature qualitative) de l'écorce de sapin blanc et du refus de compostage ainsi que de la terre fine des différents traitements et du contrôle. Ces signatures sont associées à la variabilité des signatures que l'on peut observer dans un large gradient de sol (Sebag et al. 2016).

En effet, si l'on considère l'indice HI qui représente la proportion d'énergie potentiellement disponible pour les micro-organismes (Figure 9), on constate que les signatures de la matière organique du sol pour les différents traitements sont presque identiques entre elles et à celle du témoin au regard de la variabilité des signatures de matières organiques observées sur un large éventail de types de sols (Figure 10). Bien que l'amendement ait considérablement augmenté la matière organique du sol, l'énergie contenue dans les résidus a probablement été consommée en grande partie par les micro-organismes au cours de la première année et la qualité de la matière organique est devenue quasi-homogène deux ans après l'amendement, quel que soit le traitement.

#### *Matière organique particulaire (POM)*

L'écorce en mulch ou incorporée a fait significativement ( $p < 0.05$ ) augmenter la concentration en matière organique particulaire comparativement au contrôle dès la culture de colza tandis que la différence avec le contrôle (toujours significative,  $p < 0.05$ ) était moins importante pour la culture de blé (Tableau 5). En revanche, l'augmentation de la matière organique particulaire a été plus lente pour le refus de compostage et la différence entre le refus de compostage incorporé et le contrôle était significative ( $p < 0.05$ ) uniquement pour la culture du blé. Cette évolution est comparable à la tendance observée pour le carbone organique de la terre fine (Figure 4).

Tableau 5. Matière organique particulaire plus légère que 1 g cm<sup>-3</sup> (H<sub>2</sub>O) et comprise entre 1-1.19 g cm<sup>-3</sup> (H<sub>2</sub>O-NaCl)

	H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O-NaCl	
	Colza	Blé	Colza	Blé
Contrôle	3.87 B	2.53 B	0.90 B	0.59 B
Ecorce incorporée	6.59 B	4.69 AB	2.21 AB	0.66 AB
Ecorce mulch	8.02 B	6.80 A	1.14 B	1.44 AB
Refus incorporé	15.36 A	7.89 A	3.10 A	1.14 AB
Refus mulch	13.90 A	8.67 A	2.53 A	1.68 AB A

Différentes lettres indiquent des différentes significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

$C_{mic}$

Deux mois après l'amendement, la valeur  $C_{mic}$  a augmenté, en particulier pour l'écorce qui contenait davantage de carbone labile et de composés hydrocarbonés que le refus de compostage (Figure 11). Neuf mois plus tard, la valeur  $C_{mic}$  a chuté, probablement parce qu'une grande partie du carbone labile a été consommée par les micro-organismes. Vingt-trois mois après l'amendement, les valeurs  $C_{mic}$  ont augmenté par rapport au contrôle, ce qui correspond à l'augmentation du carbone organique du sol.

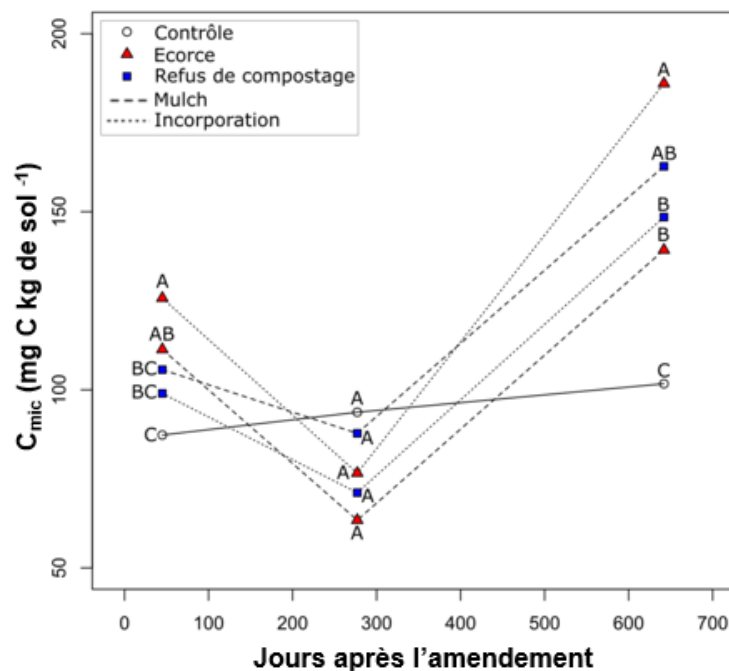
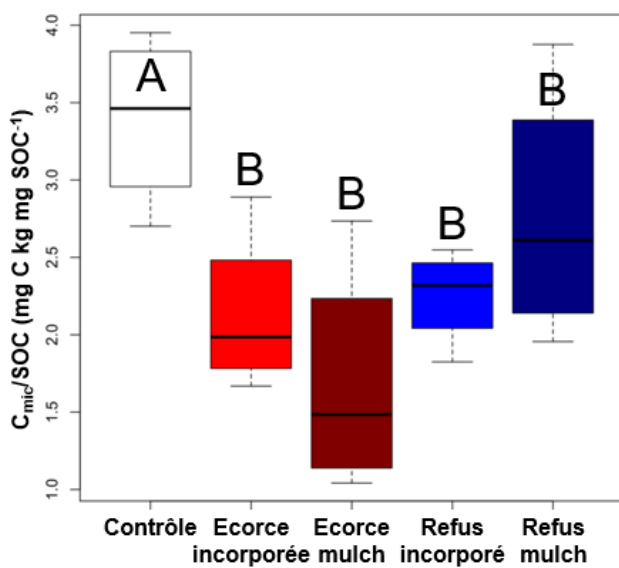
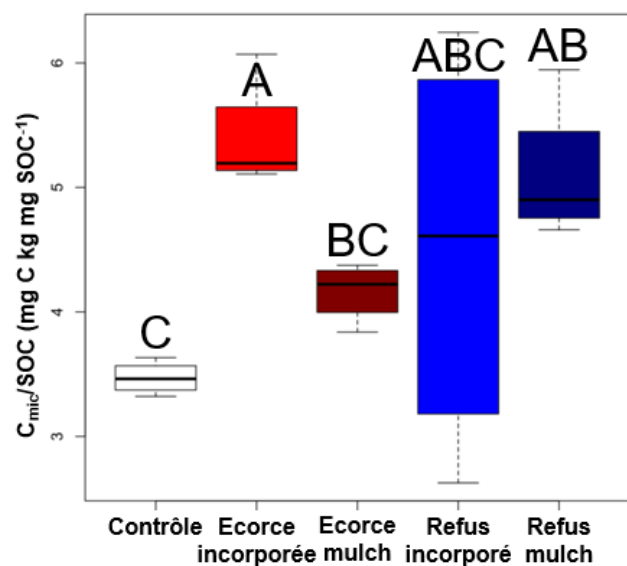


Figure 11. Valeurs de  $C_{mic}$  au début de l'essai, pendant la saison de croissance du colza puis du blé. Différentes lettres indiquent des différentes significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Si l'on examine le rapport  $C_{mic}$ /carbone organique du sol, qui est un indicateur de la qualité biologique du sol, celui-ci a diminué 9 mois après l'amendement (Figure 12) puis a augmenté 23 mois après (Figure 13), ce qui suggère que la qualité biologique du sol a été améliorée par l'amendement à moyen terme.



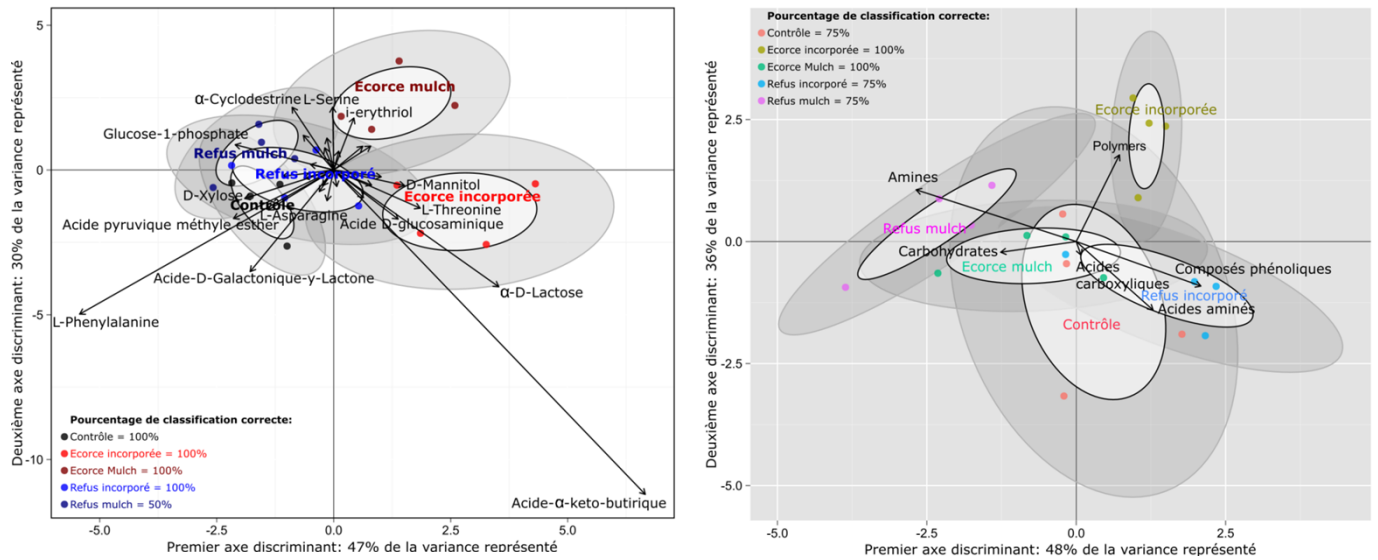
**Figure 12.** Ratio  $C_{mic}$ /carbone organique de la terre fine (SOC) 9 mois après l'amendement. Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.



**Figure 13.** Ratio  $C_{mic}$ /carbone organique de la terre fine (SOC) 23 mois après l'amendement. Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

### L'analyse des plaques Biolog (Ecoplate)

Les propriétés microbiologiques fonctionnelles ont été étudiées à l'aide de plaques biologiques permettant de quantifier l'activité de dégradation de 31 substrats différents. Les analyses discriminantes ont montré que les substrats considérés individuellement ou par types de substrat étaient dégradés spécifiquement pour chaque traitement, indiquant un changement dans la niche microbiologique spécifique au traitement (Figure 14). La discrimination (pourcentage de classification correcte) était supérieure lorsque la totalité des substrats ont été considérés individuellement, ce qui laisse supposer des interactions complexes entre activité microbiologique et niche microbiologique.



**Figure 14.** Analyse discriminante basée sur l'activité enzymatique liée à la dégradation des 31 substrats des plaques Biolog considérés individuellement ou groupés par type de molécules.

Pour isoler les effets de l'écorce de sapin blanc et de bois composté indépendamment de l'incorporation ou du mulch ont été expliqués par une combinaison linéaire des dégradations du lactose et du xylose, quelle que soit la méthode d'application (Tableau 6). À l'inverse, il a été possible de mettre en évidence l'effet de l'incorporation et du paillage, quel que soit le type de résidus ligneux. Par exemple, l'incorporation de résidus ligneux a réduit l'activité de dégradation des glucides.

**Tableau 6.** Relations linéaires permettant d'expliquer significativement ( $p < 0.05$ ) les effets du type de résidu (écorce vs bois composté) et du mode d'application (incorporation vs mulch)

Effet	Variabiles explicatives	R <sup>2</sup> ajusté
Écorce vs bois composté	lactose + xylose	0.56**
Incorporation vs mulch	carbohydrate	0.43**

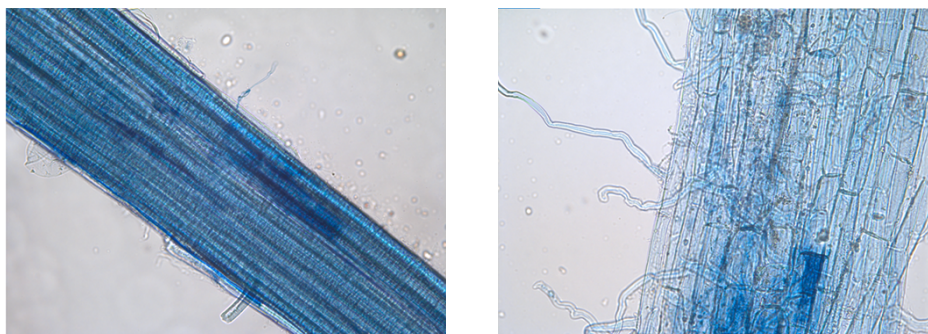
### *Mycorhizes arbusculaires*

L'incorporation des résidus ligneux semble avoir très légèrement diminué le taux d'infection de mycorhizes arbusculaire de manière non significative (Tableau 7). Comme les résidus ligneux sont largement dégradés par des champignons, il est possible que les amendements aient conduit à une

compétition au sein de laquelle les hyphes mycorhiziens (Figure 15) seraient soumis à plus de pression.

**Tableau 7.** Scoring pour les mycorhizes arbusculaires analysées sur des section de racines pour chaque traitement.

	Scoring
Contrôle	2.1 A
Ecorce incorporée	1.8 A
Ecorce mulch	1.9 A
Refus incorporé	1.8 A
Refus mulch	2.3 A



**Figure 15.** Photos des section de racines de blé prises au microscope optique (grossissements: 5000× et 10000×) avec coloration bleue des mycorhizes arbusculaires

#### *Propriétés chimiques du sol: l'azote*

En moyenne, l'amendement en résidus ligneux a permis d'augmenter la teneur en N total du sol de comparativement au contrôle de façon comparable au C organique dans la terre fine, mais les différences entre traitement n'étaient pas significatives (Tableau 8). Bien que la quantité d'N apportées par l'amendement soit a priori au moins 300 kg N ha<sup>-1</sup>, il est probable que plus de la moitié se trouve dans les résidus pas encore décomposés. Une augmentation de l'N total du sol a été observée également pour le contrôle entre l'été 2023 et 2024, probablement grâce à la culture d'engrais vert.

**Tableau 8.** Azote total (N<sub>Tot</sub>) du sol à T<sub>0</sub> (2022), après les récoltes de colza (2023) et de blé (2024).

	2022	2023	2024
Traitement	3.10 A	3.13 A	3.38 A
Contrôle	3.20 A	3.28 A	3.53 A
Ecorce incorporée	3.10 A	3.30 A	3.40 A
Ecorce mulch	3.08 A	3.30 A	3.53 A
Refus incorporé	3.20 A	3.45 A	3.55 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Comme pour le C organique, l'augmentation d'N total dans la terre fine a été plus importante pour les résidus incorporés que pour les résidus laissés en mulch.

Deux mois après l'amendement, lorsque le C<sub>mic</sub> était plus élevé (Figure 11), les valeurs de nitrate ont diminué, suggérant une immobilisation de l'azote par les micro-organismes, en particulier pour l'écorce incorporée (Tableau 9). Neuf mois après l'amendement, malgré une baisse de la biomasse microbienne, les niveaux de nitrate étaient toujours plus faibles avec les résidus qu'avec le témoin, possiblement parce qu'une partie du nitrate précédemment consommé par les micro-organismes avait été convertie en azote organique. Enfin, 23 mois après l'amendement, les niveaux de nitrate n'étaient pas différents entre le témoin et les résidus, ce qui suggère que l'immobilisation de l'azote par les micro-organismes n'était pas particulièrement favorisée malgré les valeurs C<sub>mic</sub> plus élevées (associée à une demande microbienne plus élevée), possiblement grâce à une meilleure minéralisation de l'N du sol.

**Tableau 9.**  $\text{NO}_3^{2-}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en aout 2022 (à  $T_0$ ), deux mois après l'amendement (10/10/2022), 10 mois et 22 mois après durant le stade végétatif du colza et du blé.

	Contrôle	Ecorce		Refus	
		incorporé	mulch	incorporé	mulch
$T_0$	5.45	5.09	5.91	5.41	5.19
10/10/2022	1.44 A	1.01 C	1.28 AB	1.09 BC	1.27 B
30/05/2023	5.75 AB	3.86 ABC	3.29 C	3.67 BC	5.87 A
29/05/2024	1.56	1.13	1.58	1.86	0.77

Différentes lettres indiquent des différentes significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Le  $\text{NH}_4^+$  n'a pas été influencé spécifiquement par les amendements en résidus ligneux sauf après 23 mois où les valeurs ont augmenté, en particulier pour le refus incorporé (Tableau 10).

**Tableau 10.**  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en aout 2022 (à  $T_0$ ), deux mois après l'amendement (10/10/2022), 10 mois et 22 mois après durant le stade végétatif du colza et du blé.

$\text{NH}_4$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Contrôle	Ecorce		Refus	
		incorporé	mulch	incorporé	mulch
$T_0$	0.24	0.32	0.21	0.25	0.38
10/10/2022	1.39	1.45	1.30	1.67	1.27
30/05/2023	0.82	0.49	0.86	0.77	0.72
29/05/2024	0.85 C	1.01 BC	1.24 B	1.36 A	1.03 BC

Différentes lettres indiquent des différentes significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Les valeurs de  $N_{\text{mic}}$  étaient très variables au sein des échantillons et très faible (jusqu'à non détectable) dans certains échantillons (Tableau 11). Ceci s'explique possiblement par un temps de stockage des échantillons trop long avant l'analyse en laboratoire. Compte tenu de ces valeurs peu interprétables, les analyses  $N_{\text{mic}}$  n'ont pas été effectuées pour les échantillonnages suivants.

**Tableau 11.**  $N_{\text{mic}}$  mesurés 2 mois après l'amendement

	$\text{mg N kg}^{-1}$ de sol
Contrôle	38.2 A
Refus mulch	61.9 A
Ecorce incor.	25.7 A
Refus incor.	2.2 A
Ecorce mulch	14.7 A

Différentes lettres indiquent des différentes significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

### Propriétés chimiques du sol: le phosphore

Le phosphore total n'a pas été impacté par l'amendement. Le P disponible (P-NaHCO<sub>3</sub>) n'a pas été significativement ( $p < 0.05$ ) influencé par l'amendement, bien qu'une tendance ait été observée pour les résidus incorporés tandis que pour les résidus en mulch ou le contrôle, les valeurs baissent entre 2022 (T<sub>0</sub>) et 2024 (après la culture de blé, Tableau 12). En revanche, le P immédiatement disponible (P-H<sub>2</sub>O) a été affecté négativement par les amendements d'écorce et plutôt positivement par l'amendement de bois composté durant la saison de croissance du colza et du blé.

**Tableau 12.** Effet des amendements en résidus ligneux sur le P total, le P disponible (P-NaHCO<sub>3</sub>) à T<sub>0</sub> (2022) et après la récolte de blé (2024) ainsi que le P immédiatement disponible (P-H<sub>2</sub>O) en pendant les saisons de croissance du colza (2023) et du blé (2024).

Traitement	P <sub>Tot</sub>		P-NaHCO <sub>3</sub>		P-H <sub>2</sub> O	
	2022	2024	2022	2024	Colza	Blé
Contrôle	985 A	720 A	15 A	14 A	375 AB	201 BC
Ecorce incorporée	950 A	715 A	13.5 A	14.5 A	101 B	166 C
Ecorce mulch	1030 A	733 A	16.8 A	15.5 A	62 B	209 BC
Refus incorporé	855 A	745 A	14.8 A	16.85 A	563 A	221 B
Refus mulch	805 A	760 A	16.8 A	14.5 A	464 AB	270 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

*Propriétés chimiques du sol: le pH, la capacité d'échange cationique et les alcalins totaux et échangeables*

En dépit de la dose massive de résidus ligneux amendée, le pH n'a pas été affecté significativement affecté, bien qu'une tendance à la hausse soit observée avec l'amendement (Tableau 13). Compte tenu de l'hétérogénéité de la parcelle, aucune différence significative de cation totale ou échangeable n'a été observée. Toutefois, l'incorporation du refus a augmenté le K échangeable par rapport au contrôle ou à l'écorce incorporée. Tous les traitements d'apports de résidus ligneux ont augmenté le Ca échangeable comparativement au contrôle. Le Ca échangeable a plus spécifiquement augmenté pour l'écorce incorporée comparativement aux amendement de refus.

**Tableau 13.** Propriétés chimiques du sol (pH, capacité d'échange cationique (CEC), macronutriments cationiques totaux et échangeables (dtpa)). Les différences (Diff) significatives ( $p < 0.05$ ) entre 2022 ( $T_0$ ) et 2024 des cations échangeables ont été reportées.

Traitement	pH			CEC (meq/100)		$K_{Tot}$ (g kg <sup>-1</sup> )		$K_{ech}$ (mg kg <sup>-1</sup> )		Diff	$Ca_{Tot}$ (g kg <sup>-1</sup> )		$Ca_{ech}$ (g kg <sup>-1</sup> )		Diff	$Mg_{Tot}$ (g kg <sup>-1</sup> )		$Mg_{ech}$ (g kg <sup>-1</sup> )	
	2022	2023	2024	2022	2024	2022	2024	2022	2024		2022	2024	2022	2024		2022	2024	2022	2024
Contrôle	7.23	7.28	7.28	231	206	21.3	18.9	195	204	+9B	12.83	11.83	5.54	5.41	-0.13 C	12.3	11.3	0.216	0.217
Ecorce incorporée	7.18	7.58	7.45	247	208	22.3	19.6	216	224	+8B	9.66	12.04	4.99	5.86	+0.87 A	13.0	13.2	0.228	0.220
Ecorce mulch	7.35	7.63	7.53	247	213	22.2	19.8	216	228	+12AB	10.99	12.70	5.37	5.98	+0.61 AB	12.8	13.3	0.211	0.207
Refus incorporé	7.18	7.40	7.30	237	209	21.3	19.4	195	233	+38 A	8.97	8.77	4.79	5.14	+0.35 B	12.3	12.5	0.235	0.232
Refus mulch	7.20	7.38	7.38	243	214	21.5	19.7	210	222	+12AB	9.61	10.74	5.19	5.49	+0.30 B	12.3	11.4	0.222	0.222

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

*Le potentiel rédox du sol*

Le potentiel rédox du sol a été très variable selon les échantillons et aucune tendance n'a pu être décelée (Tableau 14). Ceci s'explique probablement par le fait que l'hétérogénéité de la parcelle a eu un effet prépondérant sur le redox comparativement l'effet des résidus ligneux. Néanmoins, mesurer le rédox du sol précisément n'est pas une tâche aisée. Il est également possible que la variabilité de mesures soit aussi en partie imputable à l'instrument de mesure utilisé: les sondes combinées donnent des résultats moins répétables et plus variables que 2 demi sondes (une sonde de mesure et une sonde de référence) (Husson et al. 2016).

**Tableau 14.** Potentiel redox (Eh) des échantillons non remaniés collectés en 2024.

	Eh (mv)
Contrôle	343.9
Refus mulch	370.7
Ecorce incorporée	361.1
Refus incorporé	358.7
Ecorce mulch	336.2

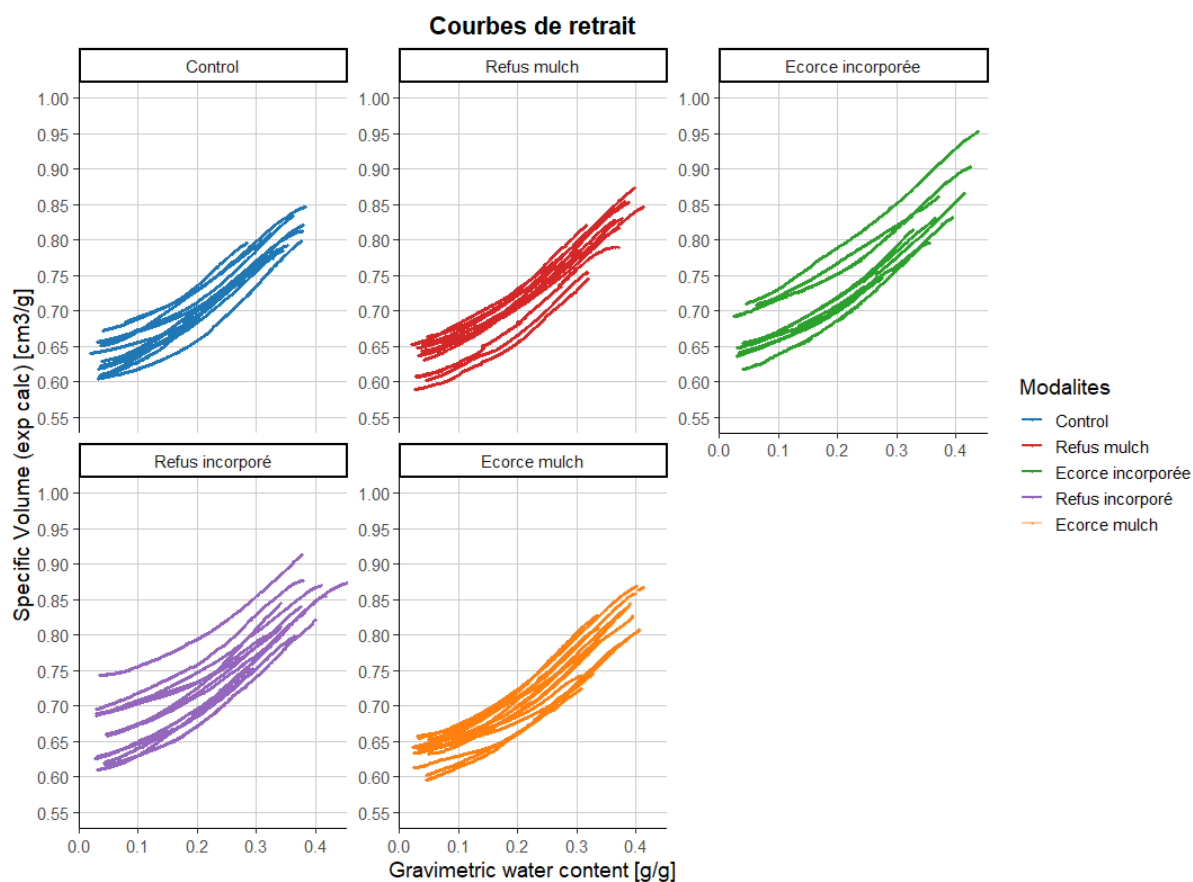
### Analyses des propriétés physiques du sol

La plupart des relations linéaires entre les propriétés physiques mesurées avec la courbe de retrait et l'argile ou le carbone organique  $C_{Org}$  sont significatives (Tableau 15). Ceci montre l'importance prépondérante du carbone dans les sols sur les propriétés physiques. La teneur en  $C_{Org}$  est influencée par la teneur en argile qui est indépendante des traitements et dont les variations entre parcelles sont préexistantes à l'essai. Cette variabilité doit donc être prise en considération pour comparer traitements en contrôlant l'effet de l'argile.

**Tableau 15.** Corrélation entre les propriétés physiques mesurées avec la courbe de retrait et l'argile ou le  $C_{Org}$ . Les propriétés correspondantes ont été notées V, W et A pour le volume spécifique, la teneur en eau gravimétrique et la teneur en air gravimétrique, respectivement, avec le potentiel matriciel ou « sec » (pour sec à l'air) en indice. En modélisant les courbes de retrait avec le modèle XP (Braudeau et al., 1999), les volumes spécifiques des porosités structurales et plasmiques et leurs contenus en air ont été quantifiés séparément pour n'importe quelle teneur eau (Schäffer et al., 2008).

Variable	$C_{Org}$	Argile	Variable	$C_{Org}$	Argile
W@30	0.40	0.22	VAE	0.61**	0.30
V@30	0.63**	0.46*	WSL	-0.25	-0.46*
W@60	0.44	0.26	VSL	0.42	-0.01
V@60	0.64**	0.48*	K0	0.37	0.40
W@100	0.62**	0.43	K2	0.49*	0.73***
V@100	0.69***	0.54*	K4	0.51*	0.50*
W@330	0.56**	0.37	Vplasmic@30	0.50*	0.32
V@330	0.67**	0.50*	Vplasmic@60	0.51*	0.34
A@30	0.40	0.43	Vplasmic@100	0.65**	0.45
A@60	0.37	0.41	Vplasmic@330	0.53*	0.37
A@100	0.44*	0.45	Vstructural@30	0.46*	0.49*
A@330	0.42	0.41	Vstructural@60	0.51*	0.52*
D@30	-0.61**	-0.45*	Vstructural@100	0.45*	0.39*
D@60	-0.62**	-0.47*	Vstructural@330	0.43	0.41
D@100	-0.70***	-0.56*	Vplasmic@MS	0.59**	0.39
D@330	-0.68**	-0.52*	Vstructural@MS	0.52*	0.50*
D_Dry	-0.43	-0.10	Vplasmic@ML	0.61**	0.38
D_Wet	-0.68**	-0.54*	Vstructural@ML	0.51*	0.50*
WMS	0.55*	0.33	Vplasmic@AE	0.31	-0.02
VMS	0.67***	0.54*	Vstructural@AE	0.45*	0.40
WML	0.61**	0.38	Vplasmic@SL	0.10	-0.25
VML	0.68***	0.52*	Vstructural@SL	0.29	0.20
WAE	0.31	-0.02			

Les relations linéaires sont statistiquement significatives à \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$



**Figure 16.** Ensemble des courbes de retrait exploitées dans le cadre du projet Intrans issues des échantillons non remaniés prélevés en juillet 2024

Les modalités « Refus mulch » et « Ecorce mulch » se comportent de manière identique à la modalité « Control » avec une très faible porosité structurale, une pente de retrait basique proche de 1, des volumes spécifiques et des teneurs en eau à saturation faibles. Les modalités « Refus incorporé » et plus particulièrement « Ecorce incorporée » semblent s'écarter de ce comportement avec une meilleure structuration et stabilité hydrostructurale (Figure 16) ce qui se confirme avec les tests statistiques de comparaison entre traitements. Cette singularité est cohérente avec la plus forte teneur en  $Ca_2^+$  pour ce traitement susceptible de favoriser les interactions avec le  $C_{Org}$  et ainsi modifier les propriétés physiques.

L'argile a été utilisée comme co-variable avant les comparaisons statistiques pour tester l'effet de l'amendement en résidus ligneux sur les propriétés physiques en s'affranchissant de l'effet de l'hétérogénéité préexistante de l'argile. Ainsi, les comparaisons entre traitements ont été effectuées en prenant les résidus des relations linéaires entre propriétés physiques et teneur en argile (Tableau 16).

L'incorporation a permis d'augmenter le volume spécifique (cad de diminuer la densité) en particulier grâce à une augmentation du volume de porosité structurale (qui permet de stocker l'eau facilement disponible et d'accueillir la vie).

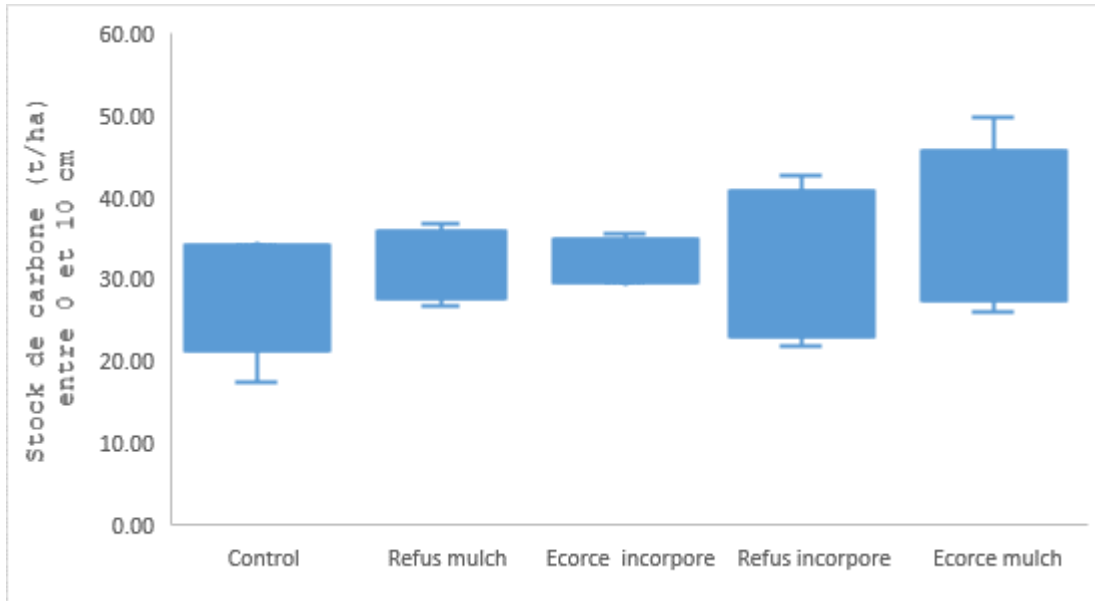
**Table 16.** Comparaison entre les traitements des résidus des relations linéaires entre propriétés physiques mesurées à l'aide de la courbe de retrait et argile.

Variable	Contrôle	Refus mulch	Refus incorporé	Ecorce Mulch	Ecorce incorporée
W@30	0.328 A	0.353 A	0.340 A	0.352 A	0.370 A
V@30	0.786 B	0.812 A	0.819 A	0.802 A	0.844 A
W@60	0.321 A	0.345 A	0.334 A	0.346 A	0.367 A
V@60	0.782 B	0.808 A	0.816 A	0.798 A	0.842 A
W@100	0.314 B	0.336 A	0.348	0.339 A	0.362 A
V@100	0.777 B	0.802 A	0.822 A	0.794 A	0.838 A
W@330	0.282 B	0.311 A	0.317 A	0.312 A	0.333 A
V@330	0.755 B	0.782 A	0.800 A	0.773 A	0.818 A
A@30	0.080 A	0.083 A	0.102 A	0.072 A	0.097 A
A@60	0.083 A	0.086 A	0.104 A	0.075 A	0.097 A
A@100	0.086 A	0.088 A	0.096 A	0.077 A	0.099 A
A@330	0.096 A	0.093 A	0.105 A	0.084 A	0.107 A
D@30	1.28 A	1.23 A	1.23 A	1.25 A	1.19 A
D@60	1.28 A	1.24 A	1.24 A	1.26 A	1.19 A
D@100	1.29 A	1.25 A	1.22 A	1.26 A	1.20 B
D@330	1.33 A	1.28 A	1.25 A	1.30 A	1.23 B
D_Dry	1.59 A	1.58 A	1.52 B	1.58 A	1.52 B
D_Wet	1.27 A	1.23 A	1.20 A	1.25 A	1.19 B
WMS	0.338 A	0.353 A	0.363 A	0.353 A	0.372 A
VMS	0.795 A	0.811 A	0.831 A	0.802 A	0.845 A
WML	0.319 A	0.337 A	0.351 A	0.338 A	0.360 A
VML	0.784 B	0.801 A	0.824 A	0.793 A	0.837 A
WAE	0.216 A	0.230 A	0.243 A	0.230 A	0.247 A
VAE	0.709 C	0.720 BC	0.744 AB	0.711 C	0.757 A
WSL	0.110 A	0.100 A	0.103 A	0.114 A	0.104 A
VSL	0.655 B	0.653 B	0.677 A	0.656 B	0.683 A
K0	0.526 A	0.539 A	0.504 A	0.616 A	0.632 A
K2	0.729 A	0.761 A	0.730 A	0.739 A	0.722 A
K4	0.336 A	0.334 A	0.302 A	0.292 A	0.350 A
Vplasmic@30	0.326 A	0.344 A	0.344 A	0.344 A	0.365 A
Vplasmic@60	0.324 A	0.342 A	0.341 A	0.343 A	0.364 A
Vplasmic@100	0.320 A	0.336 A	0.347 A	0.339 A	0.361 A
Vplasmic@330	0.290 A	0.311 A	0.317 A	0.312 A	0.332 A
Vstructural@30	0.091 A	0.091 A	0.098 A	0.080 A	0.103 A
Vstructural@60	0.088 AB	0.088 AB	0.097 AB	0.078 B	0.102 A
Vstructural@100	0.088 AB	0.089 AB	0.097 AB	0.078 B	0.100 A
Vstructural@330	0.096 A	0.093 A	0.105 A	0.084 A	0.108 A
Vplasmic@MS	0.327 A	0.344 A	0.356 A	0.344 A	0.365 A
Vstructural@MS	0.090 A	0.090 A	0.097 A	0.081 B	0.103 A
Vplasmic@ML	0.319 A	0.337 A	0.351 A	0.338 A	0.360 A
Vstructural@ML	0.087 A	0.086 A	0.095 A	0.077 B	0.100 A
Vplasmic@AE	0.216 A	0.230 A	0.243 A	0.230A	0.247 A
Vstructural@AE	0.115 A	0.112 A	0.124 A	0.103 B	0.133 A
Vplasmic@SL	0.172 A	0.176 A	0.185 A	0.182 A	0.187 A
Vstructural@SL	0.106 A	0.100 A	0.115 A	0.097A	0.118 A

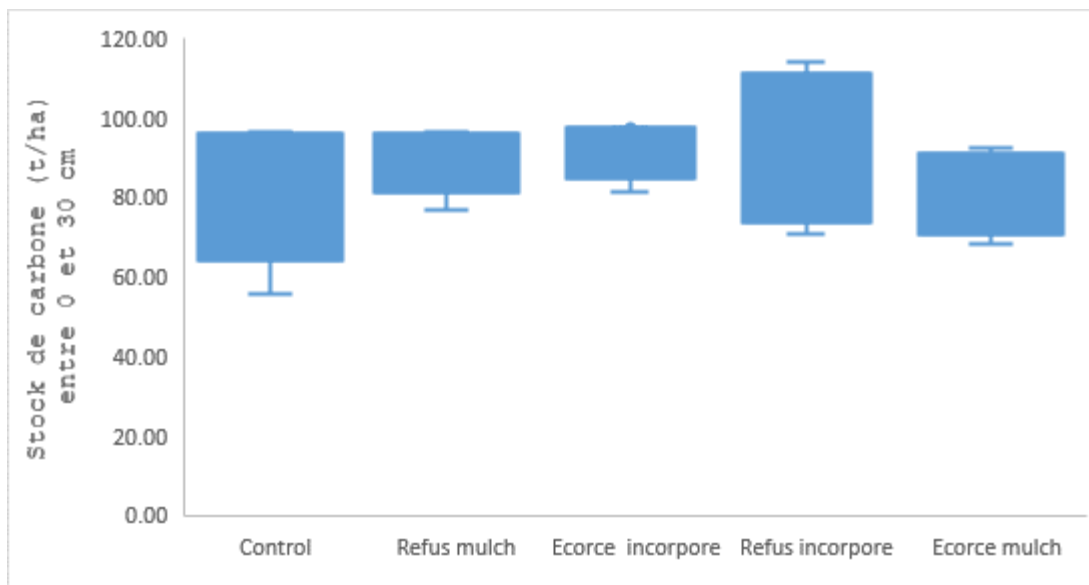
Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

### Stock de carbone

Il n'y a pas de différence significative entre modalités pour le stock de carbone quelle que soit la profondeur considérée (Figures 17 et 18). Ceci peut s'expliquer par une très forte hétérogénéité entre les 4 placettes d'une même modalité ce qui empêche de détecter des différences significatives entre modalités *in fine*.



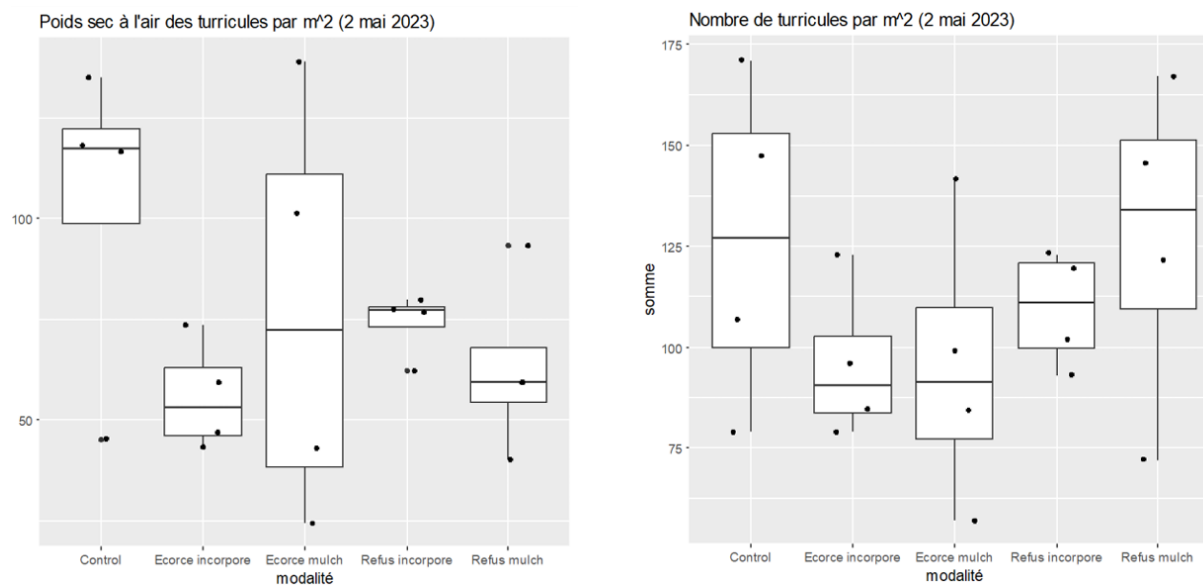
**Figure 17.** Stock de carbone mesuré en juillet 2024 sur les différentes modalités entre 0 et 10 cm de profondeur



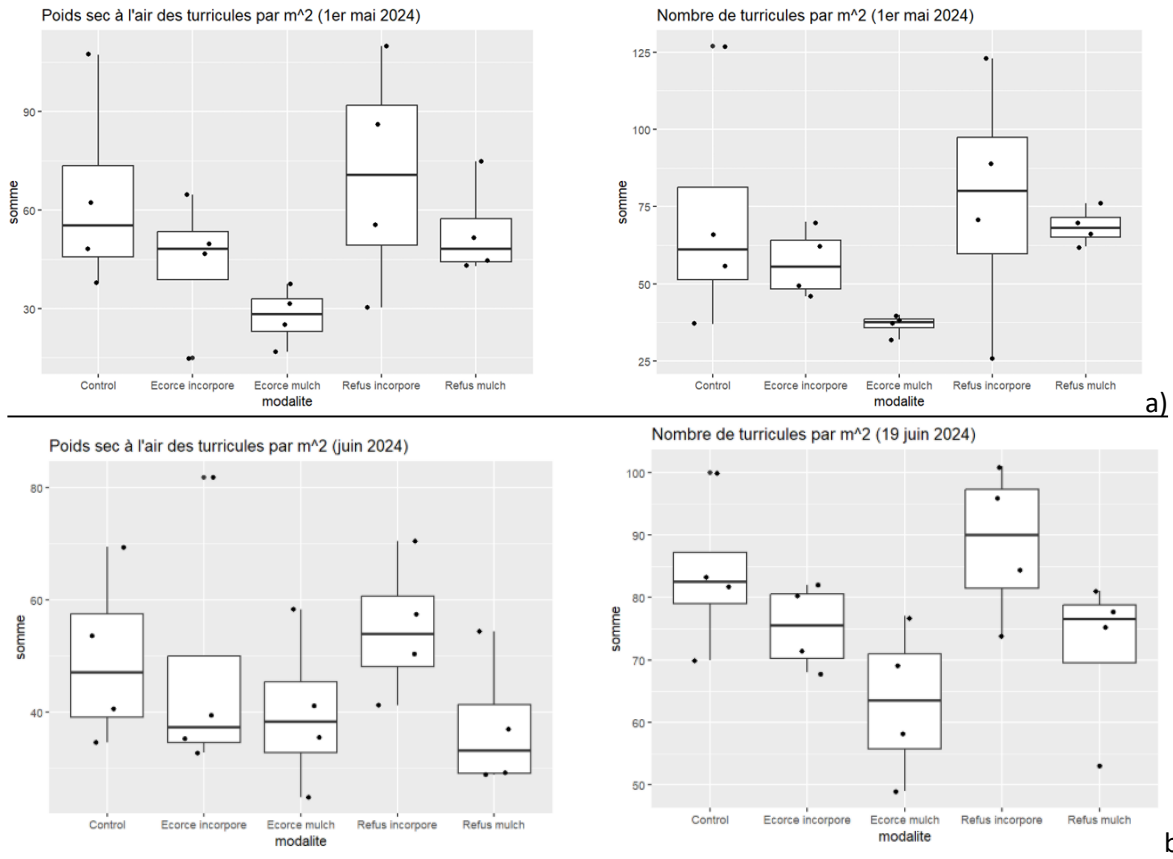
**Figure 18.** Stock de carbone mesuré en juillet 2024 sur les différentes modalités entre 0 et 30 cm de profondeur

## Activité lombricienne

Les résultats de la campagne 2023 et leur analyse statistique n'indiquent aucune différence significative entre les modalités au seuil de 10 % (Figure 19). Toutefois, la modalité « Écorce incorporée » présente les valeurs les plus faibles en nombre et en poids de turricules. En mai 2024, les analyses statistiques montrent que les placettes « Écorce mulch » ont significativement moins de turricules que le témoin, tant en poids qu'en nombre (Figure 20). Enfin, en juin 2024, cette tendance se confirme : la modalité « Écorce mulch » présente des valeurs inférieures à celles du témoin pour le poids et le nombre de turricules. Les vers de terre ont donc été a priori moins actifs dans cette modalité.



**Figure 19.** Activité lombricienne selon les modalités du projet Intrans pour la campagne du 02.05.2023 (poids sec à l'air et nombre de turricules par m²).



## La culture de colza

L'efficacité photosynthétique n'a pas été significativement influencée par les amendements de résidus ligneux (Tableau 17).

**Tableau 17.** Efficacité quantique maximale du Photosystème II (PSII) et indices de performances photosynthétiques ( $PI_{abs}$  et  $PI_{Tot}$ ).

	Fv/Fm			$PI_{abs}$			$PI_{Tot}$		
	04/04	04/05	19/05	04/04	04/05	19/05	04/04	04/05	19/05
Contrôle	0.820 A	0.816 A	0.835 A	4.86 A	4.76 A	3.57 A	7.81 A	5.41 A	3.89 A
Ecorce incorporée	0.796 A	0.781 A	0.837 A	5.11 A	2.74 A	6.29 A	6.25 A	3.44 A	3.65 A
Ecorce mulch	0.797 A	0.788 A	0.837 A	4.18 A	3.52 A	4.18 A	6.37 A	4.15 A	2.81 A
Refus incorporé	0.86 A	0.798 A	0.846 A	4.40 A	3.25 A	3.77 A	5.91 A	3.90 A	3.75 A
Refus mulch	0.813 A	0.825 A	0.839 A	4.37 A	5.11 A	5.71 A	5.38 A	4.73 A	3.36 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

La production de biomasse aérienne moyenne et la hauteur moyenne du colza ont été plus faibles suite aux amendements de résidus ligneux, mais de manière non significative ( $p < 0.05$ ) (Tableau 18). Les amendements en résidus ligneux ont diminué la teneur en chlorophylle (qui est un indicateur du statut azoté (Debaeke et al. 2006)) mesurée le 19/05/2023, c'est-à-dire en stade de floraison (Tableau 18). Ceci suggère une limitation en azote suite à l'amendement qui n'apparaît pas significativement sur le statut azoté un mois plus tôt (NNI le 28/04/2023), ni sur la teneur en chlorophylle, bien que les moyennes du contrôle soient déjà supérieures à celles des traitements. Le statut nutritionnel du phosphore semble généralement plutôt favorisé par les résidus ligneux (sauf l'écorce incorporée) sans différence significative ( $p < 0.05$ ).

**Tableau 18.** Biomasse aérienne du colza, hauteur, teneur en chlorophylle et statuts nutritionnels (NNI et PNI)

	Biomasse ( $t\ ha^{-1}$ )		Hauteur (cm)		Chlorophylle (SPAD)			NNI (%)	PNI (%)
	28 / 04	19 / 04	04 / 05	19 / 05	19 / 04	04 / 05	19 / 05	28 / 04	
Contrôle	8.8 A	88.2 A	138 A	141 A	30.1 A	88.2 A	21.4 A	74.5 A	106.8 A
Ecorce incorporée	7.2 A	72.2 A	126 A	128 A	29.3 A	72.2 A	14.8 B	73.4 A	101.1 A
Ecorce mulch	8.5 A	83.5 A	130 A	138 A	27.2 A	83.5 A	15.9 B	73.7 A	131.9 A
Refus incorporé	6.8 A	84.6 A	139 A	138 A	29.4 A	84.6 A	17.8 AB	73.3 A	116.2 A
Refus mulch	7.6 A	79.1 A	134 A	138 A	28.4 A	79.1 A	15.6 B	68.7 A	113.4 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Bien que les amendements en résidus ligneux aient eu tendance à diminuer la quantité de nutriments prélevés, aucune différence significative entre les traitements n'a été observée (Tableau 19). Les amendements n'ont pas non plus modifié les micro nutriments, ce qui suggère que les résidus ligneux n'ont pas transféré d'éléments trace métallique au colza.

**Tableau 19.** Nutriments prélevés par la biomasse de colza en stade végétatif jusqu'au 28/04/2023.

	-----kg ha <sup>-1</sup> -----					-----g ha <sup>-1</sup> -----			
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
Ctrl	170 A	21.9 A	164 A	148 A	12.7 A	432 A	163 A	28.1 A	218 A
Refus_Mulch	143 A	20.0 A	139 A	120 A	9.7 A	503 A	124 A	23.4 A	244 A
Refus_Inc	139 A	19.4 A	138 A	127 A	9.5 A	364 A	120 A	21.9 A	186 A
Ecorse_Mulch	174 A	26.4 A	174 A	153 A	11.3 A	474 A	143 A	26.4 A	254 A
Ecorse_Inc	145 A	17.5 A	149 A	124 A	10.2 A	791 A	132 A	23.5 A	195 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

#### *La culture d'engrais vert*

La biomasse de la féverole était plus importante pour le traitement écorce incorporée que pour les autres traitements, tandis que ni le niger ni la féverole n'ont été influencés (Tableau 20). De façon intéressante, la féverole, qui était la seule légumineuse, a eu une productivité supérieure sur le traitement le plus déficient en azote comparativement aux autres traitements et au contrôle, laissant penser que l'écorce incorporée pourrait induire des conditions favorables aux cultures de légumineuse.

**Tableau 20.** Influence des résidus ligneux sur la biomasse d'un plant (en g MS) de tournesol, de niger et de féverole cultivés en engrais vert en 2023.

Engrais vert	Contrôle	Ecorce		Refus	
		incorporé	mulch	incorporé	mulch
Tournesol	25.0 A	24.6 A	26.6 A	17.3 A	15.6 A
Niger	3.3 A	3.4 A	2.6 A	3.6 A	4.3 A
Féverole	3.7 B	7.3 A	4.4 B	3.8 B	3.0 B

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

#### *La culture de blé*

À l'opposé de ce qui a été observé pour la culture de colza (Tableau 18), l'écorce incorporée a positivement influencé la production de biomasse aérienne, notamment grâce à des plants ayant un diamètre de tige supérieur au contrôle et aux autres traitements (Tableau 21). La plus forte masse de la feuille drapeau ainsi que la plus forte teneur en chlorophylle avec l'écorce incorporée comparativement aux autres amendements suggère une absence de carence azotée, une tendance qui peut également être confirmée par le statut azoté (NNI). Pour les autres traitements, la carence en N semble se prolonger pour les deux cultures. Alors que l'écorce incorporée ne semblait pas limitée en azote, le mulch d'écorce semblait le plus affecté, ce qui suggère que l'application en mulch peut prolonger la durée de la carence en azote.

**Tableau 21.** Biomasse du blé, traits écophysologiques et status nutritionnels (NNI, PNI et KNI)

	Biomasse	hauteur	diamètre	Masse foliaire	Surface foliaire	Chlorophylle	NNI	PNI	KNI
	t ha <sup>-1</sup>	cm	mm	mg	cm <sup>2</sup>	SPAD	%	%	%
Contrôle	7.0 A	43.8 A	3.88 B	184 A	27.6 A	22.2 A	84.0 A	95.0 A	79.8 A
Ecorce incorporée	7.5 A	40.9 AB	5.72 A	180 A	28.2 A	22.1 AB	83.8 A	99.3 A	84.0 A
Ecorce mulch	7.0 A	37.6 B	3.70 B	159 B	23.3 B	17.8 C	70.0 A	93.8 A	79.8 A
Refus incorporé	6.6 A	41.7 AB	3.87 B	163 B	24.3 AB	20.2 ABC	77.5 A	90.5 A	80.5 A
Refus mulch	7.8 A	40.2 AB	3.78 B	172 AB	25.4 AB	18.7 BC	74.3 A	90.0 A	80.3 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

Le prélèvement en nutriment n'a pas été affecté significativement par les amendements de résidus ligneux bien que la moyenne de l'N absorbé soit notablement plus faible pour le traitement écorce mulch que pour les autres traitements (Tableau 22). Les amendements en résidus ligneux ont eu tendance à diminuer l'absorption du Fe (non significativement,  $p < 0.05$ ) tandis que les autres micronutriments n'ont pas été impactés.

**Tableau 22.** Nutriments prélevés par la biomasse de blé en stade végétatif.

	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
	kg ha <sup>-1</sup>					g ha <sup>-1</sup>			
Contrôle	135 A	17.7 A	136 A	25 A	5.1 A	7008 A	1766 A	327 A	1168 A
Ecorce incorporée	108 A	16.7 A	131 A	23 A	4.5 A	5060 A	1773 A	295 A	1062 A
Ecorce mulch	142 A	19.6 A	151 A	29 A	5.8 A	5795 A	2011 A	371 A	1334 A
Refus incorporé	123 A	16.7 A	136 A	24 A	5.1 A	5317 A	1639 A	319 A	1042 A
Refus mulch	123 A	17.6 A	142 A	24 A	4.9 A	5441 A	1896 A	315 A	1139 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les traitements.

### La culture de sorgho

La conductance stomatique du sorgho était plus élevée pour l'écorce en mulch et le refus incorporé, ce qui ne semble donc pas lié à la réserve en eau du sol qui reste inchangée pour les mulch de résidus ligneux et maximisée avec l'incorporation, en particulier pour l'écorce (Tableau 23). Les plus faibles valeurs de conductance stomatique observées pour l'écorce incorporé possiblement est en lien avec la plus faible production de biomasse aérienne du sorgho dont l'activité photosynthétique n'a pas été optimisée.

**Tableau 23.** Rendement et poids de mille grains (PMG) des cultures de colza, blé et sorgho.

	Conductance stomatique (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Chlorophylle (SPAD)	Biomasse (g)
Contrôle	0.120 B	28.2 A	50.8 A
Ecorce incorporée	0.117 B	25.0 A	39.3 B
Ecorce mulch	0.141 A	24.2 A	47.8 AB
Refus incorporé	0.145 A	26.7 A	49.3 A
Refus mulch	0.141 B	25.3 A	48.8 AB

Différentes lettres indiquent des différences significatives (p < 0.05) entre les traitements.

#### *Rendement en grain*

Malgré les signes de carences en N sur les différentes cultures étudiées dans le cadre de ce projet, les rendements en grains de colza n'ont pas été affecté négativement par l'amendement (Tableau 24). La fertilisation semble avoir compensé cet effet. Une légère diminution du rendement en graines de blé a été observée pour le refus de compostage, mais elle ne semble pas être due à une carence en azote, mais plutôt à la verse du blé et/ou aux dommages causés par les animaux dans les champs. Cette hypothèse peut être étayée par le fait que la biomasse aérienne de la production de blé n'a pas été influencée à la fin du stade végétatif. Enfin, aucun effet n'a été observé sur la qualité des grains. Ceci montre qu'il est possible d'apporter un amendement massif de résidus ligneux sans limiter le rendement de grain.

**Tableau 24.** Rendement et poids de mille grains (PMG) des cultures de colza, blé et sorgho.

	Rendement (t ha <sup>-1</sup> )			PMG (g)		
	Colza	Blé	Sorgho	Colza	Blé	Sorgho
Contrôle	1.53 A	3.8 A	6.5 A	4.14 A	39.8 A	26.6 A
Ecorce incorporée	1.45 A	4.0 A	6.0 A	4.16 A	39.8 A	24.6 A
Ecorce mulch	1.98 A	4.0 A	6.2 A	4.06 A	41.4 A	28.6 A
Refus incorporé	1.49 A	3.3 AB	7.1 A	4.14 A	39.1 A	28.2 A
Refus mulch	1.65 A	2.9 B	6.6 A	3.96 A	41.5 A	28.1 A

Différentes lettres indiquent des différences significatives (p < 0.05) entre les traitements.

#### *La lutte contre les adventices*

Des extraits des résidus ont montré la présence de principes actifs allélopathiques dans l'écorce fraîche de conifère. Également, des essais en serre ont montré que l'écorce peut diminuer la production végétale de biomasse aérienne. Au champ, les écorces ont permis de diminuer le nombre de repousses de blé due à la culture précédente mais d'autres espèces d'adventices se sont développées à la place. L'écorce n'a pas permis de contrôler efficacement contre le développement des adventices tout au long de la culture. De même, l'épaisseur de 3 cm des mulchs d'écorce ou de refus de compostage n'a pas permis de contrôler le développement des adventices tout au long de la culture, néanmoins elle a permis de réduire de moitié le développement des adventices aux stades précoces. Uniquement l'utilisation de résidus ligneux pour contrôler les adventices nécessiterait des doses plus importantes en mulch ce qui ne semble pas réaliste en grande cultures dont les grandes surfaces impliqueraient des quantités énormes de résidus ligneux. Toutefois, le mulch apparaît comme une méthode prometteuse pour réduire les adventices aux stades précoces qui pourrait être combiné avec d'autres méthodes en cours de saison, par exemple le sarclage que le colza ne supporte pas au stade de plantule (voir le manuscrit en annexe).

## 8. Avantages pour la pratique

La valorisation agronomique de résidus ligneux en grandes cultures, avec priorité à l'incorporation plutôt qu'au mulch, offre des bénéfices tangibles et rapides : hausse du carbone organique de la terre fine dès la première année et gain de porosité structurale accompagné d'une stabilité hydro-structurale accrue, ce qui optimise l'infiltration, la réserve utile en eau et la résilience des sols face aux stress hydriques. Ces effets, corroborés par l'augmentation du rapport  $C_{mic}/C_{Org}$  à moyen terme et par des niches microbiologiques adaptées au type de résidu et au mode d'application, se traduisent en prestations agronomiques durables sans péjorer ni les rendements ni la qualité des grains lorsque la faim d'azote initiale est maîtrisée par une fertilisation ajustée.

Cette pratique de valorisation des résidus ligneux contribue (1) à la mise à disposition et à la sécurisation du potentiel de production des prestations de la forêt/bois, en convertissant des flux hétérogènes d'écorces et de refus de compostage en amendements fonctionnels qui renforcent structure et fertilité des sols ; (2) à l'optimisation des processus via des itinéraires techniques éprouvés (incorporation ciblée aux profondeurs efficaces, suivi  $N_{Min}$  et  $C_{mic}$ ) et une gestion opérationnelle compatible avec les calendriers culturaux ; (3) à la mise en œuvre de la diversité des assortiments de bois, en démontrant l'interopérabilité de plusieurs types de résidus ligneux dans des sols à texture fine sans effets négatifs durables ; (4) au développement de nouvelles possibilités d'utilisation du bois, en instaurant une boucle circulaire de recyclage local qui réduit les coûts de gestion des résidus et crée de la valeur agronomique.

Finalement, la combinaison « incorporation + pilotage N » constitue une option flexible et transférable (adaptable en mulch lorsque les contraintes opérationnelles l'exigent, en intégrant la durée un peu plus longue de la faim d'azote) qui répond aux exigences de la pratique, efficiente et orientée vers la compétitivité de la filière forêt-bois, avec des indicateurs simples ( $C_{Org}$ ,  $C_{mic}/C_{Org}$ ,  $N_{Min}$ ,  $V_{structural}$ ) facilitant le transfert aux praticiens.

## 9. Conclusions

Ce projet a été réalisé sur un essai *in situ* sur lequel de grandes quantités de ces résidus ligneux (300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) ont été incorporées ou épandues sous forme de mulch. Des cultures de colza, d'engrais vert, de blé puis de sorgho ont ensuite été effectuées. Les effets des différents amendements sur les propriétés du sol, la nutrition et les performances des cultures ainsi que sur le développement des plantes adventices ont été quantifiés. Ce projet comporte les résultats d'analyses de propriétés chimiques, biologiques et physiques des sols. Différents traits écophysologiques des cultures ont été mesurés ainsi que les nutriments contenus dans la biomasse aérienne et les grains ont été analysés.

L'amendement en résidus ligneux a permis d'augmenter drastiquement la teneur en matière organique en surface, en particulier avec l'incorporation. Compte tenu de l'hétérogénéité des résidus ligneux utilisés dans cette étude et de leur effet assez comparable sur la teneur et la qualité du C organique du sol, cette étude suggère que la totalité des différents types de résidus ligneux (de bois non traité) peut être utilisé comme amendement en grande culture dans des sols à texture fine pour augmenter la teneur en matière organique.

Aussi, les résultats de cette étude montrent que l'incorporation des résidus ligneux est nécessaire pour améliorer les propriétés physiques en créant de la porosité structurale (qui stocke l'eau facilement disponible et accueille la vie), tandis que le mulch n'influence pas la physique du sol à l'échelle de temps de ce projet.

L'amendement en résidus ligneux a généré une faim en azote, de façon plus immédiate suite à l'incorporation et sur une plus longue durée lorsque les résidus étaient apportés sous forme de mulch. Les résidus plus riches en composés hydrocarbonés ont plus fortement activé la biomasse microbienne, ce qui peut légèrement amplifier le phénomène de faim d'azote. Toutefois, bien que des indicateurs écophysologiques aient mis en évidence un effet négatif sur les cultures, la fertilisation azotée a permis de surmonter la problématique sans que le rendement en grain ni sa qualité ne soient affectés. Des cultures de légumineuses pourraient être préconisées suite à un amendement en résidu ligneux.

Enfin, cette étude a mis en évidence un effet allélopathique des écorces de sapin blanc. L'amendement d'écorce de sapin blanc ainsi que le mulch ont permis de réduire la pression des adventices aux stades précoces, mais n'étaient pas suffisants pour contrôler le développement des plantes adventices pendant toute la durée de la culture de colza. Aussi, le mulch et/ou les écorces de sapin blanc pourraient être utilisés en synergie avec d'autres méthodes pour contrôler les adventices plus tard dans la saison (comme par exemple le sarclage que le colza supporte mal au stade de plantule).

## **10. Remerciements**

Merci au Soutien à la Recherche Forêt et Bois en Suisse (FOBO-CH) d'avoir soutenu financièrement ce projet. Merci également aux institutions HEPIA et Agroscope d'avoir soutenu ce projet financièrement, d'avoir mis à disposition leurs infrastructures et leur personnel pour mener à bien ce projet. Merci également à l'ensemble des acteurs de ce projet, d'avoir travaillé consciencieusement pour mener ce projet avec succès et d'avoir pu effectuer de nombreuses tâches parfois exigeantes en temps, en implication personnelle et en expertises scientifiques.

## 11. Références bibliographiques

- Abouzienna H, Hafez O, El-Metwally I, et al (2008) Comparison of weed suppression and mandarin fruit yield and quality obtained with organic mulches, synthetic mulches, cultivation, and glyphosate. *HortScience* 43:795–799
- Arminjon L (2020) Etude de faisabilité de l'utilisation de Bois Raméal Fragmenté (BRF) au sein d'exploitations suisses. Bachelor of Science Agronomie, HEPIA Genève
- Aydinalp C, Porca MM (2004) The effects of pesticides in water resources. *Journal of Central European Agriculture* 5:5–12
- Ayilara MS, Adeleke BS, Akinola SA, et al (2023) Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in microbiology* 14:1040901
- Behar F, Beaumont V, Penteado HDB (2001) Rock-Eval 6 technology: performances and developments. *Oil & Gas Science and Technology* 56:111–134
- Benković ET, Grohar T, Žigon D, et al (2014) Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial crops and products* 52:23–28
- Bielinis E, Kwiatkowski J, Boiko S (2019) Identification of *Pinus sylvestris* clones with highest and lowest allelopathic potential. *Baltic Forestry* 25:
- Boivin P, Garnier P, Tessier D (2004) Relationship between clay content, clay type, and shrinkage properties of soil samples. *Soil Science Society of America Journal* 68:1145–1153
- Bonner MR, Alavanja MC (2017) Pesticides, human health, and food security. *Food and energy security* 6:89–93
- Borges ROP, Burns BMB, Moraes BCP, et al (2024) Impacts of organic mulching on soil temperature, moisture content and weed growth. *Revista Brasileira de Gestao Ambiental e Sustentabilidade* 11:1241–1254
- Braudeau E, Costantini J, Bellier G, Colleuille H (1999) New device and method for soil shrinkage curve measurement and characterization. *Soil Science Society of America Journal* 63:525–535
- Cadot S, Bélanger G, Ziadi N, et al (2018) Critical plant and soil phosphorus for wheat, maize, and rapeseed after 44 years of P fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 112:417–433
- Combarrous Y (2017) Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *Comptes Rendus Biologies* 340:406–409
- Debaeke P, Rouet P, Justes E (2006) Relationship between the normalized SPAD index and the nitrogen nutrition index: application to durum wheat. *Journal of plant nutrition* 29:75–92
- Deluz C, Sebag D, Verrecchia E, Boivin P (2024) Soil organic matter thermal pools as influenced by depth, tillage, and soil texture—A Rock-Eval® analysis study on the cropland soils of the Swiss Plateau. *Geoderma* 445:116871
- Disnar J-R, Guillet B, Kérais D, et al (2003) Soil organic matter (SOM) characterization by Rock-Eval pyrolysis: scope and limitations. *Organic geochemistry* 34:327–343

- Dupla X, Gondret K, Sauzet O, et al (2021) Changes in topsoil organic carbon content in the Swiss leman region cropland from 1993 to present. Insights from large scale on-farm study. *Geoderma* 400:115125
- Dupla X, Lemaître T, Grand S, et al (2022) On-Farm Relationships Between Agricultural Practices and Annual Changes in Organic Carbon Content at a Regional Scale. *Frontiers in Environmental Science* 314
- Duryea ML, English RJ, Hermansen LA (1999) A comparison of landscape mulches: chemical, allelopathic, and decomposition properties. *Arboriculture & Urban Forestry (AUF)* 25:88–97
- Elliott L, McCalla T, Waiss Jr A (1978) Phytotoxicity associated with residue management. *Crop residue management systems* 31:131–146
- État de Vaud Protéger nos sols, une nécessité vitale, Etude préliminaire sur la qualité des sols agricoles et la séquestration de carbone organique pour le Plan climat cantonal
- Farooq M, Jabran K, Cheema ZA, et al (2011) The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest management science* 67:493–506
- Fontana M, Bélanger G, Hirte J, et al (2021) Critical plant phosphorus for winter wheat assessed from long-term field experiments. *European Journal of Agronomy* 126:126263
- Fontana M, Hirte J, Bélanger G, et al (2022) Long-term K fertilization effects on soil available K, grain yield, and plant K critical value in winter wheat. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 123:63–82
- Fontana M, Johannes A, Zaccone C, et al (2023) Improving crop nutrition, soil carbon storage and soil physical fertility using ramial wood chips. *Environmental Technology & Innovation* 31:103143
- Gaines TA, Duke SO, Morran S, et al (2020) Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry* 295:10307–10330
- Gasser MO, Laverdière MR, N'dayegamiye A (1995) Short-term effects of crop rotations and wood-residue amendments on potato yields and soil properties of a sandy loam soil. *Canadian Journal of Soil Science* 75:385–390
- Gilli C (2012) Le bois raméal fragmenté (BRF)
- Granatstein D, Mullinix K (2008) Mulching options for northwest organic and conventional orchards. *HortScience* 43:45–50
- Greenly KM, Rakow DA (1995) The effect of wood mulch type and depth on weed and tree growth and certain soil parameters. *Journal of Arboriculture* 21:225–225
- Hou B, Wu L (2010) Safety impact and farmer awareness of pesticide residues. *Food and agricultural immunology* 21:191–200
- Husson O, Husson B, Brunet A, et al (2016) Practical improvements in soil redox potential (Eh) measurement for characterisation of soil properties. Application for comparison of conventional and conservation agriculture cropping systems. *Analytica Chimica Acta* 906:98–109

- Jenkinson DS, Brookes PC, Powlson DS (2004) Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 36:5–7
- Joergensen RG, Mueller T (1996) The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEN value. *Soil biology and biochemistry* 28:33–37
- Johannes A, Weisskopf P, Schulin R, Boivin P (2019) Soil structure quality indicators and their limit values. *Ecological indicators* 104:686–694
- Justes E, Mary B, Meynard J-M, et al (1994) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* 74:397–407
- Kaur R, Choudhary D, Bali S, et al (2024) Pesticides: An alarming detrimental to health and environment. *Science of the Total Environment* 915:170113
- Kazemi F, Jozay M (2020) Allelopathic effects of some organic mulch extracts on seed germination and early growth of some ornamental plants.
- Khamare Y, Chen J, Marble SC (2022) Allelopathy and its application as a weed management tool: A review. *Frontiers in Plant Science* 13:1034649
- Kumar D, Sinha SN, Rajendra S, Sharma K (2023) Assessing farmer's exposure to pesticides and the risk for non-communicable diseases: A biomonitoring study. *Science of the Total Environment* 891:164429
- Lafargue E, Marquis F, Pillot D (1998) Rock-Eval 6 applications in hydrocarbon exploration, production, and soil contamination studies. *Revue de l'institut français du pétrole* 53:421–437
- Lemaire G, Salette J, Sigogne M, Terrasson J-P (1984) Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I.--Etude de l'effet du milieu. *Agronomie* 4:423–430
- Ligneau L, Watt T (1995) The effects of domestic compost upon the germination and emergence of barley and six arable weeds. *Annals of Applied Biology* 126:153–162
- Masson P, Dalix T, Bussière S (2010) Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Communications in soil science and plant analysis* 41:231–243. <https://doi.org/10.1080/00103620903460757>
- McCalla T, Norstard FA (1974) Toxicity problems in mulch tillage. *Agriculture and Environment* 1:153–174
- McKinlay R, Plant J, Bell J, Voulvoulis N (2008) Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment international* 34:168–183
- Mia MJ, Massetani F, Murri G, Neri D (2020) Sustainable alternatives to chemicals for weed control in the orchard-a Review. *Horticultural Science* 47:
- Mostafalou S, Abdollahi M (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology* 268:157–177

- Motmainna M, Juraimi A, Uddin MK, et al (2021) Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: A review. *Allelopathy Journal* 52:21–40
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- N'dayegamiye A, Angers D (1993) Organic matter characteristics and water-stable aggregation of a sandy loam soil after 9 years of wood-residue applications. *Canadian journal of soil science* 73:115–122
- OFEV Stratégie nationale sur les sols
- Olsen SR (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Department of Agriculture
- Paut R, Valantin-Morison M, Rayon B, et al (2025) Critical nitrogen dilution curves for winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) along the whole crop cycle: A Bayesian analysis. *European Journal of Agronomy* 168:127642
- Pelosi C, Bertrand C, Daniele G, et al (2021) Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 305:107167
- Popp J, Pető K, Nagy J (2013) Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development* 33:243–255
- Putnam AR, DeFrank J (1983) Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. *Crop protection* 2:173–181
- Qiu D, Ke M, Zhang Q, et al (2022) Response of microbial antibiotic resistance to pesticides: An emerging health threat. *Science of the Total Environment* 850:158057
- Rapport du Conseil fédéral, 2017 Plan d'action visant à la réduction des risques et à l'utilisation durable des produits phytosanitaires
- Rathinasabapathi B, Ferguson J, Gal M (2005) Evaluation of allelopathic potential of wood chips for weed suppression in horticultural production systems. *HortScience* 40:711–713
- Romano P, Mordos LS, Stifani M, et al (2025) Allelopathic properties of compost: could we use a fertilizer as an herbicide for tree crops? *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 37:1–18
- Saha D, Marble SC, Pearson BJ (2018) Allelopathic effects of common landscape and nursery mulch materials on weed control. *Frontiers in plant science* 9:733
- Schäffer B, Schulin R, Boivin P (2008) Changes in shrinkage of restored soil caused by compaction beneath heavy agricultural machinery. *European journal of soil science* 59:771–783
- Taylor RJ, Shaw DC (1983) Allelopathic effects of Engelmann spruce bark stilbenes and tannin–stilbene combinations on seed germination and seedling growth of selected conifers. *Canadian Journal of Botany* 61:279–289

- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry* 19:703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vijgen J, Weber R, Lichtensteiger W, Schlumpf M (2018) The legacy of pesticides and POPs stockpiles—a threat to health and the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 25:31793–31798. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3188-3>
- Webber SM, Bailey AP, Huxley T, et al (2022) Traditional and cover crop-derived mulches enhance soil ecosystem services in apple orchards. *Applied Soil Ecology* 178:104569
- Xuan T, Tawata S, Khanh T, Chung I (2005) Decomposition of allelopathic plants in soil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191:162–171
- Zhou W, Li M, Achal V (2025) A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. *Emerging Contaminants* 11:100410

## 12. Annexes

# Can ligneous residues be recycled for weed control in field crops?

Mario Fontana<sup>1\*</sup>, Luca Bragazza<sup>1</sup>, Saïd Elfouki<sup>1</sup>, Sandie Masson<sup>2</sup>, Aurelie Gfeller<sup>2</sup>, Pascal Boivin<sup>3</sup>, Ophélie Sauzet<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Agroscope, Field-Crop Systems and Plant Nutrition, Nyon (Switzerland)

<sup>2</sup>Agroscope, Weed Science in Arable Crops, Nyon (Switzerland)

<sup>3</sup>HEPIA, University of Applied Sciences and Arts of Western Switzerland, Soils and Substrates, Jussy, (Switzerland)

### Summary

The use of pesticides in agriculture causes serious problems to human health and the environment, so that alternative solutions for weed control are urgently requested. In this study we test the possibility to recycle composted wood and white fir bark as biopesticide at three different experimentation scales. In a first Petri dish experiment, hot water extracts of the recycled ligneous residues were used for a germination test with rapeseed and winter wheat seeds. In a pot experiment, two successive cycles of rapeseed sowings were carried out with an equivalent of 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> and 600 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of ligneous residues so to assess the effect on crop seedling biomass. In a third field experiment, 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of each of the two ligneous residues were spread as mulch or incorporated into the soil just before the sowing of rapeseed in 2022 without any herbicide application. We observed that fresh bark extract prevented winter wheat and rapeseed germination, while extracts of decomposed bark and composted wood did not affect crop germination. In the greenhouse, during the first sowing, the biomass of rapeseed seedlings was lower with both types of ligneous residues compared to the control, particularly with bark. However, only the bark showed a persisting allelopathic effect on crop seedlings during the second sowing, even if the effect was lower compared to the first sowing. In the field, only the bark had a negative effect on the number of emerging weeds during the autumn 2022, while no difference in weed biomass was observed between treatments in the following 2023 spring. Overall, the 3-cm thick mulch was not sufficient to control the weed biomass in the field, and this resulted in a rather low rapeseed yield due to strong weed competition. Higher amounts of ligneous residues would

probably yield better results as long as the field management would avoid contact between crop roots and ligneous chips due to the allelopathic effect.

**Keywords:** white fir bark, composted wood, biopesticide, mulch, germination, seedling growth, weed biomass

\*Corresponding author: Mario Fontana, E-mail address: [mario.fontana@agroscope.admin.ch](mailto:mario.fontana@agroscope.admin.ch)

## Introduction

The use of pesticides can be a danger to human health and can cause numerous environmental problems (Vijgen et al. 2018; Kaur et al. 2024; Zhou et al. 2025). Many pesticides are endocrine disruptors (McKinlay et al. 2008; Combarous 2017) and can cause a range of serious diseases (Mostafalou and Abdollahi 2013), particularly in farmers who are directly exposed to them (Hou and Wu 2010; Kumar et al. 2023). Pesticide residues in food are a cause of concern for consumers (Bonner and Alavanja 2017). Furthermore, the use of pesticides can threaten the quality of water resources (Aydinalp and Porca 2004) as well as soil biodiversity ultimately reducing soil fertility (Pelosi et al. 2021). In addition, the use of pesticides can induce antibiotic resistance with indirect threat to human health (Qiu et al. 2022), whereas that of herbicides can favour the development of resistant weeds (Gaines et al. 2020). In the absence of alternative solutions, however, their use is necessary to ensure high crop yields and the economic survival of farmers (Popp et al. 2013).

Finding alternative solutions that eliminate or significantly decrease the use of synthetic pesticides is therefore crucial. The use of natural allelopathic molecules (= biopesticides) could be a sustainable and environmentally friendly solution that poses fewer risks to human health and the environment (Ayilara et al. 2023). Some formulations based on plant extracts are currently available on the market, but their use in agriculture remains sporadic and technically complicated (Khamare et al. 2022). The half-life of allelopathic compounds of biopesticides is generally short and their manufacture is costly (Motmainna et al. 2021). A potential solution would be to eliminate the need for costly extraction and formulation processes by directly using organic wastes as biopesticides.

The application of a mulch of wood chips is an alternative method to synthetic herbicides allowing to control weeds particularly in urban areas (Borges et al. 2024) and in orchards (Granatstein and Mullinix 2008; Mia et al. 2020; Webber et al. 2022). Water extractions from wood chips have demonstrated allelopathic effects on various tree species (Duryea et al. 1999; Rathinasabapathi et al. 2005; Saha et al. 2018). Wood chips as mulch can combine the effect of the allelopathic compounds with the physical effect of preventing light from reaching the soil and, in this way, preventing the germination of weeds (Khamare et al. 2022). The minimum mulch thickness required to be effective is not clearly defined and probably depends on the context, although a thickness of 3 cm can be sufficient in some cases (Putnam and DeFrank 1983). In large-scale farming such as field crops, the use of wood chips as mulch to control weeds is not common. In such a context, wood chips should target weeds without affecting negatively the cash crop germination and growth. In addition, the quantities required to cover large surfaces may be too much in relation to the availability of wood chips and/or their cost, which can become a limiting factor.

In this study we test the potential of recycling ligneous residues as bioherbicides to control weeds in field crops with the advantage of promoting the recycling of industrial waste products. To reach this goal, we combine germination tests, a greenhouse trial as well as a field trial using two types of ligneous residues to assess if: i) they contain water-soluble and anti-germination compounds that can affect the germination of cash crop seeds; ii) they have allelopathic effects on the growth of rapeseed seedlings in two successive greenhouse trials; and iii) they can control weed development in the field after application of  $300 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  of ligneous residues as mulch (i.e. 3 cm thick) or incorporated into the soil.

## **Material and method**

### *Origin of wood residues*

In this study two types of ligneous residues were tested, i.e. white fir bark and composted wood. At “La Rippe” sawmill, the white fir (*Abies alba*) logs are stored before being sawn and the white fir bark flakes off during storage, hereafter simply referred as “barks”. The barks are then stored as a pile which includes fresh and partly decomposed barks (Figure S1). The volumes of stored bark generated represent a constraint for the sawmill.

The second ligneous residue is represented by composted wood that is produced at the “Gros-de-Vaud” composting facility. Here, after three months of composting, the produced compost is sieved to be sold. However, some of the ligneous residues have not reached a sufficient stage of decomposition to be transformed into compost and remain on the sieve to form “composted wood” that then represents for the composting facility a restrictive by-product.

### *Germination test on two cash crops*

Hot water extracts were from composted wood, fresh barks and decomposed barks. In 1 l beaker, 500 ml of each of the three ligneous residues were placed and a similar volume of demineralized water was added, i.e. about 500 ml. The beakers were then placed in an oven at  $40^\circ\text{C}$  for 48 hours to perform the hot water extractions. Next, the solution contained in each beaker was filtered using a kitchen strainer.

The germination test was carried out by scattering 20 winter wheat and 20 rapeseed seeds on two sheets of blotting paper placed on top of each other (to optimize humidity) in a Petri dish with a diameter of 13.5 cm. There were four treatments, i.e., fresh bark, partly decomposed bark, composted wood, as well as demineralized water as control with four replicates per treatment for each of the two selected crops so as a total of 32 Petri dishes. The seeds were then periodically moistened by spraying the correspondent ligneous extract or demineralized water for the control. The Petri dishes were

incubated at constant humidity was maintained with 18 hours per day at 21°C with light in an incubator and 6 hours per day at 10°C without light to favor seeds germination. The number of germinated and viable seeds was then counted after 7 days of incubation [Proficiency Test Documents - International Seed Testing Association](#).

#### *Greenhouse experiment on rapeseed growth*

Surface (0-15 cm) soil was collected from a Calcaric Cambisol (sand = 338 g kg<sup>-1</sup>, silt = 425 g kg<sup>-1</sup> and clay = 237 g kg<sup>-1</sup> SOC = 14.6 g kg<sup>-1</sup>), airdried and sieved at 2mm mesh size. Pots (15 cm diameter and 11 cm high) were filled with soil only (= control) or a mixture of soil and fresh white fir bark (from La Rippe sawmill), or soil and decomposed white fir bark, or soil and composted wood (from Gros-de-Vaud compost company) at doses equivalent to 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> and 600 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>. The doses were calculated based on the surface area of the pot, i.e.  $7.5^2 \times \pi \times 3 = 530 \text{ cm}^3$  and  $7.5^2 \times \pi \times 6 = 1060 \text{ cm}^3$  per pot as an input equivalent to 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> and 600 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>. One batch of soil/ligneous residues was prepared for the 4 pots replicates of each treatment. In a box, 4 pot volumes of soil were homogenized with 4 volumes of ligneous residues and then, 4 pots were fulfilled with the mixture. Greenhouse temperature and air humidity were maintained at 18-22 °c and 80%, respectively. Then, 6 rapeseed seeds were sown in each pot on June 15, 2022. Watering was carried out to keep the soil moistened. On June 28, 2022, the six emerging seedlings from each pot were collected, counted, and freshly weighed to calculate the average biomass of seedling in each pot. The same pots were then kept and the experiment was repeated with second sowing of rapeseed that was carried out on July 6. Similarly, rapeseed seedlings were then collected, counted, and weighed on July 18, 2022.

#### *Field trial*

The field trial was carried out at Agroscope-Nyon on an agricultural field conducted in conventional farming since decades and characterized by a Calcaric Cambisol (sand = 214 g kg<sup>-1</sup>, silt = 339 g kg<sup>-1</sup> and clay = 447 g kg<sup>-1</sup>, SOC = 277 g kg<sup>-1</sup>). Here, 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of (white fir bark) residues (from La Rippe sawmill) and composted wood (from Gros-de-Vaud compost company) was spread on the 24<sup>th</sup> August 2022 on 8 m × 8 m plots to form each a 3 cm thick mulch layer. A rototiller was then used to incorporate the white fir bark or composted wood on four plots, while the mulch was left intact on four other plots distributed randomly in the field. A total of 20 plots were set up for the 4 replicates × 5 treatments, i.e. control without residues vs incorporated white fir bark vs white fir bark mulch vs incorporated composted wood vs composted wood mulch. Rapeseed (*Brassica napus*) was sown at a density of 320'000 seeds ha<sup>-1</sup> with a row spacing of 50 cm using an precision seed drill (Kuhn) combined with a strip-tiller, preventing the bark or the composted wood from coming into contact with the seeds and concentrating these ligneous residues in the row spacing in order to maximize the inhibition of

weed growth. For the goal of this study, neither herbicides nor mechanical weeding were applied during the rapeseed growth.

On October 8, 2022, a botanical survey of adventitious flora was carried out on four 50 cm squares ( $4 \times 0.25 \text{ m}^2$ ) randomly placed on each of the plots in order to determine the density of each adventitious specie. On March 10, 2023, four squares were again laid out and the adventitious plants were collected, dried, and weighed. For this study, wheat regrowth (from the previous year) was counted separately from the rest of the weed flora. Rapeseed (*Brassica napus*) was harvested with a Haldrup combiner on a  $16 \text{ m}^2$  surface area on June 26, 2023.

### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed in the R environment, versions 4.0.2 (R Core Team 2020). For each experiment, treatments were compared using the Least Significant difference method with the `pairw.anova` function from the *asbio* package.

## **Results**

### *Germination test*

Fresh bark extract prevented the germination of both winter wheat and rapeseed seeds (Table 1). In contrast, water extract from decomposed bark and composted wood did not hamper the percentage of germinability of the seedlings compared to the control. According to visual observations, fresh bark water extract likely decreased radicle length of rapeseed (Figure S2).

**Table 1.** Proportion of viable germinated seedlings receiving water extracts from the three ligneous residues, i.e., fresh white fir bark, decomposed white fir bark, and composted wood residues, as well as pure water as control. Each value is the mean of 4 replicates. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  for the same crop species between the five treatments.

<b>Treatment</b>	<b>Wheat (%)</b>	<b>Rapeseed (%)</b>
Control	93 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>
Fresh white fir bark	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Decomposed white fir bark	94 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>
Composted wood	88 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>

### Greenhouse experiment

Overall, the biomass of rapeseed seedling tended to decrease (i.e. not significantly) from the 1<sup>st</sup> sowing to the 2<sup>nd</sup> sowing only for the control, whereas the seedling biomass tended to increase in all the other treatments (Table 2).

**Table 2.** Mean biomass of one rapeseed seedling and mean germination rate after the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> sowing. Each value is the mean of 4 pot replicates where 6 grains per pot were initially sown. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  for the same sowing between the six treatments.

Treatments	1 <sup>st</sup> sowing	2 <sup>nd</sup> sowing	1 <sup>st</sup> sowing	2 <sup>nd</sup> sowing
	Seedling biomass (mg)		Germination (%)	
Control	919 <sup>a</sup>	749 <sup>a</sup>	67 <sup>ab</sup>	79 <sup>a</sup>
Fresh bark (300 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	188 <sup>bcd</sup>	434 <sup>ab</sup>	83 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>
Fresh bark (600 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	132 <sup>cd</sup>	245 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>
Decomposed bark (300 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	250 <sup>bcd</sup>	438 <sup>ab</sup>	54 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>
Decomposed bark (600 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	91 <sup>d</sup>	176 <sup>b</sup>	71 <sup>ab</sup>	75 <sup>ab</sup>
Composted wood (300 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	357 <sup>bc</sup>	472 <sup>ab</sup>	79 <sup>a</sup>	75 <sup>ab</sup>
Composted wood (600 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	435 <sup>b</sup>	694 <sup>a</sup>	71 <sup>ab</sup>	75 <sup>ab</sup>

Compared to the control, after the 1<sup>st</sup> sowing the mean biomass of each rapeseed seedling was significantly lower in all the treatments. Overall, both the fresh and the decomposed bark were associated to lower rapeseed biomass compared to the composted wood, indicating a higher allelopathic effect for bark which clearly increased with increasing the relative dose (Table 2). Not significant differences were observed between fresh and decomposed bark residues.

At the end of the 2<sup>nd</sup> sowing, the differences between the control and the treatments decreased (Table 2). Indeed, there was an overall increase of the seedling biomass in all the ligneous treatments compared to the first sowing with the lowest biomass observed in the 600 m<sup>3</sup> equivalent treatment of fresh and composted bark. The results of the second sowing seem to indicate a reduced allelopathic effects of ligneous residues.

We also observed that seedling height decreased specifically if roots developed in the vicinity of ligneous chips (Figure S3).

Germination rate was lower for the “decomposed bark (300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>)” treatment compare to other treatments for the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> sowing.

### *Field trial*

In autumn 2022, after two months since the start of the field trial, both the incorporated and the mulch treatments with bark significantly decreased the number of emerged weed seedlings compared to the other treatments (Table 3). Such a decrease was mainly due to a reduction of wheat regrowth from the previous year. The number of weeds also tended to be lower in response to composted wood addition as mulch. Allelopathy effect of bark, and mulch in a lower extent, was mainly due to a lower winter wheat regrowth from the previous harvest.

**Table 3.** Number of emerged weed seedlings per square meter measured in October 2022 in the rapeseed field trial. Each value is the mean of 4 replicates. The total number of weeds has been separated into two categories: re-growth of previous winter wheat and other weed species. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  for the same variable between the five treatments.

<b>Treatment</b>	<b>Total (number/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Wheat regrowth (number/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Other weeds (number/m<sup>2</sup>)</b>
Control	16.1 <sup>a</sup>	6.3 <sup>a</sup>	9.9 <sup>a</sup>
Incorporated composted wood	16.0 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	9.9 <sup>a</sup>
Mulch of composted wood	12.9 <sup>ab</sup>	5.8 <sup>ab</sup>	7.1 <sup>a</sup>
Incorporated bark	9.6 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b</sup>	7.1 <sup>a</sup>
Mulch of bark	8.3 <sup>b</sup>	1.6 <sup>b</sup>	6.7 <sup>a</sup>

In spring 2023, total weed biomass did not differ between treatments even if higher total biomass was observed in the plots receiving the composted wood both as incorporated and as mulch (Table 4). Furthermore, there was not any difference in terms of other weed biomass among treatments, whereas bark as mulch and as incorporated continued to have a lower biomass of winter wheat regrowth (Table 4).

**Table 4.** Mean weed biomass measured in April 2023 in the rapeseed field trial. Each value is the mean of 4 replicates. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  for the same variable between the five treatments.

Treatment	Total	Wheat	Other weeds
		regrowth (kg ha <sup>-1</sup> )	
Control	1093 <sup>a</sup>	796 <sup>ab</sup>	297 <sup>a</sup>
Incorporated composted wood	1440 <sup>a</sup>	1139 <sup>a</sup>	301 <sup>a</sup>
Mulch of composted wood	1339 <sup>a</sup>	1007 <sup>b</sup>	332 <sup>a</sup>
Incorporated bark	834 <sup>a</sup>	388 <sup>ab</sup>	446 <sup>a</sup>
Mulch of bark	792 <sup>a</sup>	186 <sup>b</sup>	606 <sup>a</sup>

Rapeseed yields largely differed across plots and ranged between 1.4 t ha<sup>-1</sup> and 3.9 t ha<sup>-1</sup> (dry weight) due to field heterogeneity. However, no significant differences were found between treatments where we observed a mean grain yield corresponding to 2.1 t ha<sup>-1</sup> for control, 2.2 t ha<sup>-1</sup> for the mulch of composted wood, 2.0 t ha<sup>-1</sup> for the incorporated composted wood, 2.6 t ha<sup>-1</sup> for the mulch of bark and 2.1 t ha<sup>-1</sup> for the incorporated bark.

## Discussion

The Petri dish test showed an anti-germinative effect of the hot water extract from the fresh white fir bark on winter wheat and rapeseed seeds (Table 1). Several studies have demonstrated the anti-germinative effect of water extracts from mulch derived from different tree species (Taylor and Shaw 1983; Saha et al. 2018; Kazemi and Jozay 2020), whose allelopathic compounds can vary in efficiency depending on the clone or organ of the tree species (Bielinis et al. 2019). Anti-germinative effect may be linked to numerous molecules such as certain phenolic acids, fatty acids, hormones, or terpenes, which are capable of inhibiting water absorption or interfering with biochemical mechanisms related to dormancy (Romano et al. 2025). A ligneous residues:water mass ratio of 10% can be sufficient to demonstrate allelopathic effects (Rathinasabapathi et al. 2005). Although the germination test was carried out with a highly concentrated water extract, given the high wood residue/water volumetric ratio ( $\approx 100\%$ ), the decomposed bark extract did not interfere with germination (Table 1). This suggests that most of the water-extractable anti-germinative compounds initially contained in the fresh bark were lost as leachates during bark decomposition at the sawmill facility. Nevertheless, the growth of rapeseed rootlets after germination still appears to have been negatively affected by the decomposed bark extract, while the roots of winter wheat were not affected (Figures S2). Similarly, the absence of allelopathic effects from the water extract of composted wood indicates that almost all the soluble anti-germinative compounds were lost and/or degraded during the composting process (Romano et al. 2025).

The results of the greenhouse experiment clearly showed as all the treatments with ligneous residues had an allelopathic effect on biomass production of rapeseed seedlings only during the first sowing cycle (Table 2). However, the allelopathic effect of composted wood was lower than that of bark, which is consistent with the results of the germination test. Nevertheless, a comparison of the results of germination test and the greenhouse trial for the rapeseed suggests that the anti-germinative compounds in fresh bark extracted with hot water were different from those that reduced seedling biomass production since germination and seedling growth were negatively affected by different treatments. As allelopathic compounds can be released in different ways (e.g., by solubilization or following the decomposition of organic matter (Duryea et al. 1999)), their nature can be widely different. Allelopathic compounds can be classified into 14 categories according to their chemical similarities, and their water solubility can vary (e.g., water-soluble organic acids vs long chains of fatty acids) (Khamare et al. 2022). Some allelopathic compounds may be less soluble and more efficient (Rathinasabapathi et al. 2005). In our greenhouse experiment, allelopathic effects have only been observed on seedlings within a few millimeters of the ligneous residue (Figure S3; personal observation), suggesting that active allelopathic compounds have diffused very little into the soil. This observation explains why the application of  $600 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , which increased the contact area between

seedlings and wood chips by a factor of 2 compared to an application of 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, was more efficient (Table 2). For the second rapeseed sowing, only the application of 600 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of bark (fresh or decomposed) produced a significant allelopathic effect compared to the control, which was, however, less pronounced than for the first sowing. This suggests that the half-life of the allelopathic compounds of bark were rather limited. In general, solubilized allelopathic compounds remain highly active for about ten days and can persist for up to 50 days (Xuan et al. 2005), which is consistent with our results.

In the field trial, only the bark treatment showed an allelopathic effect on the number of weed seedlings emerging in autumn, two months after the rapeseed sowing (Table 3). However, bark treatment did not efficiently control weed growth in spring (Table 4), confirming the short effect as observed in the greenhouse trial. Nevertheless, bark modified the weed flora by specifically reducing the winter wheat regrowth density in autumn and biomass in spring. This result seems to indicate that bark has a more effective allelopathic effect on certain species such as graminoids. The spectrum of species preferentially targeted by compounds contained in bark (such as phenolic acids, flavonoids, lignans (Benković et al. 2014)) should be clarified in future studies. Bark could possibly be mixed with other chemical herbicides, as already suggested by other authors (Farooq et al. 2011), in order to reduce the load of plant protection products per hectare. In addition, this specific allelopathic effect of bark could also reinforce the mulch effect since graminoid weeds are less affected by the physical constraints of mulch compared to other weed species (Abouziena et al. 2008).

Under our experimental field conditions, ligneous residues as mulch tended to reduce weed emergence and biomass compared to the incorporation (Tables 3 and 4), but the expected anti-germinative effect (due to the soil cover preventing light from reaching the soil) was not significant ( $p < 0.05$ ) and largely insufficient to control weed development without a combined strategy with other weed management levers (non-chemical preventive and curative). This highlights that a mulch thickness of 3 cm only was not sufficient to achieve the expected physical effect under our experimental conditions. In the literature, contrasting results were reported from greenhouse experiments. For example, a 5 cm thick gravel mulch (i.e., used as a control to quantify the allelopathic effect of wood chip mulch) had no effect on weed growth compared to no mulch (Rathinasabapathi et al. 2005), while a 3 cm layer of mulch was reported to be sufficient to significantly reduce weed growth (Putnam and DeFrank 1983), without the allelopathic and physical effects being quantified separately. Nevertheless, a 3 cm thick layer of mulch can specifically affect the emergence of smaller seeds, which have a lower hypocotyl elongation potential than larger seeds (Ligneau and Watt 1995). In orchards, recycling green waste or pruning residues can be used to produce a thicker layer of wood chips mulch (up to 25 cm) (Greenly and Rakow 1995), which is almost guaranteed to be effective. On the other hand, spreading mulch 5-10 cm thick on large farms seems complicated given the quantities of woody material this would represent per hectare (i.e., 500-1000 m<sup>3</sup>) and the availability of the resource.

Although the allelopathic effect of ligneous residues capable of decreasing crop performance was highlighted for more than 50 years (McCalla and Norstard 1974), it can be avoided by distributing the ligneous residues so to avoid any contact with the seed rows (Elliott et al. 1978). Accordingly, nor emergence of rapeseed neither final grain yield was negatively affected by ligneous residues compared to control, probably because the strip-tiller avoided contact between rapeseed roots and ligneous residues. However, the high weed biomass (Table 4), due to the absence of any weed management other than ligneous residues, likely competed with rapeseed plants causing a lower yield compared to contiguous field treated with herbicide (data not shown).

## **Conclusions**

This study investigated the possibility of recycling ligneous residues as biopesticides on crop seed germination, on crop seedling development and on weed density at early crop stages and weed biomass before crop flowering, under field conditions. White fir bark showed a strong anti-germinative effect on rapeseed and winter wheat seeds. Bark and, to a lesser extent, composted wood still had an allelopathic effect on the growth of rapeseed seedlings. In the field, the effect of ligneous residues on weed growth was limited. Although bark significantly reduced the number of emerging weed seedlings two months after sowing and greatly limited the density of winter wheat regrowth, no difference in total weed biomass was observed eight months after sowing, either when the ligneous residues were incorporated into the soil or applied as mulch. A 3-cm thick layer of mulch was not sufficient to control the weeds without any other weed management techniques but seems promising as part of an integrated weed management strategy. A higher amount of mulch would be limiting for field crops given the volumes of woody material that this would be required. However, the allelopathic effect of bark on winter wheat regrowth could potentially be used in combination with a reduced herbicide application or other agronomic weed management, even if special care should be taken so to avoid that away ligneous residues are in contact with the crop seedlings, for example using a strip-tiller for crop sowing. Although we reported a limited effect of solely recycled ligneous residues as biopesticides for weed control under field conditions, the input of organic matter to agricultural soils is an added value that should be considered for improving soil quality.

## **Funding**

This project has been realized with the support of the “Soutien à la Recherche Forêt et Bois en Suisse (FOBO-CH)” (KWL) though the project INTRANT. Additional support from Agroscope is acknowledged as part of the Working Program AP22-25.

## References

- Abouziena H, Hafez O, El-Metwally I, et al (2008) Comparison of weed suppression and mandarin fruit yield and quality obtained with organic mulches, synthetic mulches, cultivation, and glyphosate. *HortScience* 43:795–799
- Arminjon L (2020) Etude de faisabilité de l'utilisation de Bois Raméal Fragmenté (BRF) au sein d'exploitations suisses. Bachelor of Science Agronomie, HEPIA Genève
- Aydinalp C, Porca MM (2004) The effects of pesticides in water resources. *Journal of Central European Agriculture* 5:5–12
- Ayilara MS, Adeleke BS, Akinola SA, et al (2023) Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in microbiology* 14:1040901
- Behar F, Beaumont V, Penteadó HDB (2001) Rock-Eval 6 technology: performances and developments. *Oil & Gas Science and Technology* 56:111–134
- Benković ET, Grohar T, Žigon D, et al (2014) Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial crops and products* 52:23–28
- Bielinis E, Kwiatkowski J, Boiko S (2019) Identification of *Pinus sylvestris* clones with highest and lowest allelopathic potential. *Baltic Forestry* 25:
- Boivin P, Garnier P, Tessier D (2004) Relationship between clay content, clay type, and shrinkage properties of soil samples. *Soil Science Society of America Journal* 68:1145–1153
- Bonner MR, Alavanja MC (2017) Pesticides, human health, and food security. *Food and energy security* 6:89–93
- Borges ROP, Burns BMB, Moraes BCP, et al (2024) Impacts of organic mulching on soil temperature, moisture content and weed growth. *Revista Brasileira de Gestao Ambiental e Sustentabilidade* 11:1241–1254
- Cadot S, Bélanger G, Ziadi N, et al (2018) Critical plant and soil phosphorus for wheat, maize, and rapeseed after 44 years of P fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 112:417–433
- Combarrous Y (2017) Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *Comptes Rendus Biologies* 340:406–409
- Debaeke P, Rouet P, Justes E (2006) Relationship between the normalized SPAD index and the nitrogen nutrition index: application to durum wheat. *Journal of plant nutrition* 29:75–92
- Duryea ML, English RJ, Hermansen LA (1999) A comparison of landscape mulches: chemical, allelopathic, and decomposition properties. *Arboriculture & Urban Forestry (AUF)* 25:88–97
- Elliott L, McCalla T, Waiss Jr A (1978) Phytotoxicity associated with residue management. *Crop residue management systems* 31:131–146
- Farooq M, Jabran K, Cheema ZA, et al (2011) The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest management science* 67:493–506

- Fontana M, Bélanger G, Hirte J, et al (2021) Critical plant phosphorus for winter wheat assessed from long-term field experiments. *European Journal of Agronomy* 126:126263
- Fontana M, Hirte J, Bélanger G, et al (2022) Long-term K fertilization effects on soil available K, grain yield, and plant K critical value in winter wheat. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 123:63–82
- Fontana M, Johannes A, Zaccone C, et al (2023) Improving crop nutrition, soil carbon storage and soil physical fertility using ramial wood chips. *Environmental Technology & Innovation* 31:103143
- Gaines TA, Duke SO, Morran S, et al (2020) Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry* 295:10307–10330
- Gasser MO, Laverdière MR, N'dayegamiye A (1995) Short-term effects of crop rotations and wood-residue amendments on potato yields and soil properties of a sandy loam soil. *Canadian Journal of Soil Science* 75:385–390
- Gilli C (2012) Le bois raméal fragmenté (BRF)
- Granatstein D, Mullinix K (2008) Mulching options for northwest organic and conventional orchards. *HortScience* 43:45–50
- Greenly KM, Rakow DA (1995) The effect of wood mulch type and depth on weed and tree growth and certain soil parameters. *Journal of Arboriculture* 21:225–225
- Hou B, Wu L (2010) Safety impact and farmer awareness of pesticide residues. *Food and agricultural immunology* 21:191–200
- Husson O, Husson B, Brunet A, et al (2016) Practical improvements in soil redox potential (Eh) measurement for characterisation of soil properties. Application for comparison of conventional and conservation agriculture cropping systems. *Analytica Chimica Acta* 906:98–109
- Jenkinson DS, Brookes PC, Powlson DS (2004) Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 36:5–7
- Joergensen RG, Mueller T (1996) The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k<sub>EN</sub> value. *Soil biology and biochemistry* 28:33–37
- Justes E, Mary B, Meynard J-M, et al (1994) Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* 74:397–407
- Kaur R, Choudhary D, Bali S, et al (2024) Pesticides: An alarming detrimental to health and environment. *Science of the Total Environment* 915:170113
- Kazemi F, Jozay M (2020) Allelopathic effects of some organic mulch extracts on seed germination and early growth of some ornamental plants.
- Khamare Y, Chen J, Marble SC (2022) Allelopathy and its application as a weed management tool: A review. *Frontiers in Plant Science* 13:1034649

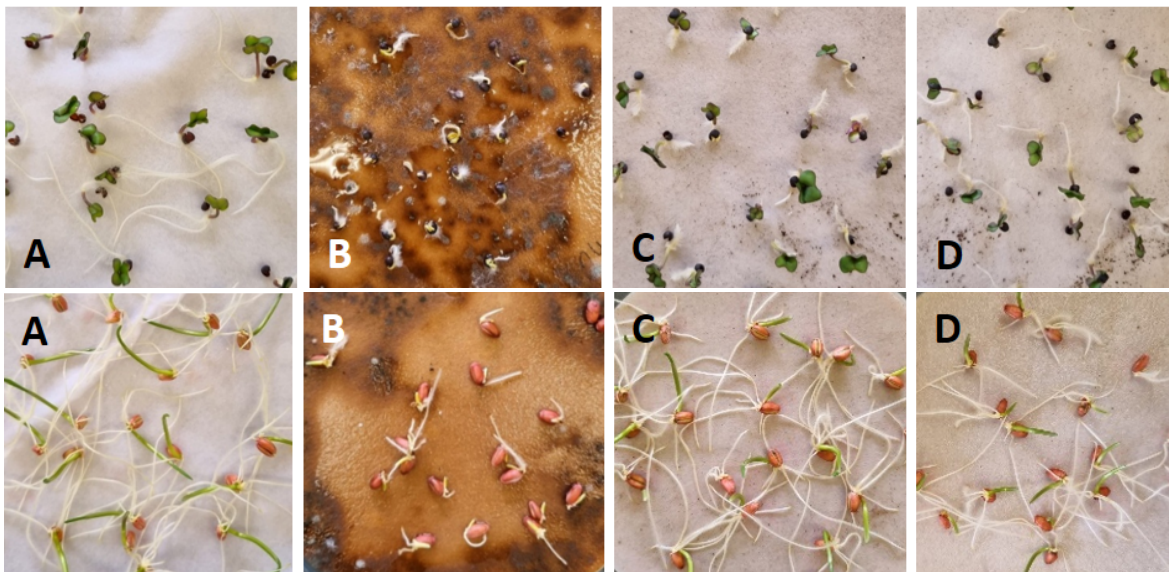
- Kumar D, Sinha SN, Rajendra S, Sharma K (2023) Assessing farmer's exposure to pesticides and the risk for non-communicable diseases: A biomonitoring study. *Science of the Total Environment* 891:164429
- Lemaire G, Salette J, Sigogne M, Terrasson J-P (1984) Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I.--Etude de l'effet du milieu. *Agronomie* 4:423–430
- Ligneau L, Watt T (1995) The effects of domestic compost upon the germination and emergence of barley and six arable weeds. *Annals of Applied Biology* 126:153–162
- Masson P, Dalix T, Bussière S (2010) Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Communications in soil science and plant analysis* 41:231–243. <https://doi.org/10.1080/00103620903460757>
- McCalla T, Norstard FA (1974) Toxicity problems in mulch tillage. *Agriculture and Environment* 1:153–174
- McKinlay R, Plant J, Bell J, Voulvoulis N (2008) Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment international* 34:168–183
- Mia MJ, Massetani F, Murri G, Neri D (2020) Sustainable alternatives to chemicals for weed control in the orchard-a Review. *Horticultural Science* 47:
- Mostafalou S, Abdollahi M (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology* 268:157–177
- Motmainna M, Juraimi A, Uddin MK, et al (2021) Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: A review. *Allelopathy Journal* 52:21–40
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Olsen SR (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Department of Agriculture
- Paut R, Valantin-Morison M, Rayon B, et al (2025) Critical nitrogen dilution curves for winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) along the whole crop cycle: A Bayesian analysis. *European Journal of Agronomy* 168:127642
- Pelosi C, Bertrand C, Daniele G, et al (2021) Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 305:107167
- Popp J, Pető K, Nagy J (2013) Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development* 33:243–255
- Putnam AR, DeFrank J (1983) Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. *Crop protection* 2:173–181
- Qiu D, Ke M, Zhang Q, et al (2022) Response of microbial antibiotic resistance to pesticides: An emerging health threat. *Science of the Total Environment* 850:158057

- Rapport du Conseil fédéral, 2017 Plan d'action visant à la réduction des risques et à l'utilisation durable des produits phytosanitaires
- Rathinasabapathi B, Ferguson J, Gal M (2005) Evaluation of allelopathic potential of wood chips for weed suppression in horticultural production systems. *HortScience* 40:711–713
- Romano P, Mordos LS, Stifani M, et al (2025) Allelopathic properties of compost: could we use a fertilizer as an herbicide for tree crops? *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 37:1–18
- Saha D, Marble SC, Pearson BJ (2018) Allelopathic effects of common landscape and nursery mulch materials on weed control. *Frontiers in plant science* 9:733
- Taylor RJ, Shaw DC (1983) Allelopathic effects of Engelmann spruce bark stilbenes and tannin–stilbene combinations on seed germination and seedling growth of selected conifers. *Canadian Journal of Botany* 61:279–289
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry* 19:703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vijgen J, Weber R, Lichtensteiger W, Schlumpf M (2018) The legacy of pesticides and POPs stockpiles—a threat to health and the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 25:31793–31798. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3188-3>
- Webber SM, Bailey AP, Huxley T, et al (2022) Traditional and cover crop-derived mulches enhance soil ecosystem services in apple orchards. *Applied Soil Ecology* 178:104569
- Xuan T, Tawata S, Khanh T, Chung I (2005) Decomposition of allelopathic plants in soil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191:162–171
- Zhou W, Li M, Achal V (2025) A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. *Emerging Contaminants* 11:100410

## Supplementary material



**Figure S1.** Ligneous residues: bark flakes off during logs storage (a), fresh and decomposed white fir barks (B) and composted wood (C)



**Figure S2.** Radicle and hypocotyl of rapeseed (above) and winter wheat (below) seedlings in the petri dishes following the germination test with demineralized water (A), water extract from fresh white fir bark residues (B), water extract from decomposed white fir bark residues (C), and water extract from composted wood.



**Figure S3.** Allelopathic effect of white fir bark at the vicinity of the roots of rapeseed seedlings after the first sowing in the greenhouse trial (surrounded in red). In comparison, a seedling grown in the same pot but not at the vicinity of bark (surrounded in green).

# Coloration des Mycorhizes (IDEAL 42)

## Préparation des solutions

### Colorant

Un sachet est prévu pour 10l de solution finale, il contient 15,2g de poudre. Il faut faire une solution stock 10x concentrée à diluer avec de l'eau acétique.

### Solution stock de colorant 10x conc. :

1,52g dans un flacon

100ml eau distillée bouillante, ajouter, agiter pour dissoudre

### Solution de colorant pour utilisation

1ml de colorant solution stock

2ml d'acide acétique 5%

7ml d'eau osmosée

### Solution stock concentrée d'eau acétique à 5%

5ml acide acétique 100% p.a.

95ml eau osmosée

Diluer 5x lors de l'utilisation comme diluant du colorant

Diluer 10x lors de l'utilisation comme eau acétique de lavage

### Solution de KOH 10%

Dans eau osmosée

Faire suivant le  
nombre  
d'échantillon

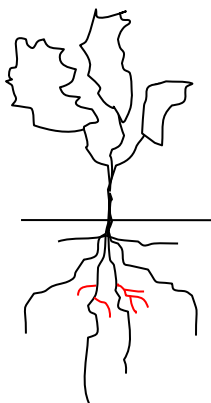
## Méthode

Prendre des racines chevelues de vigne.

Pour les plantes en pleine terre, creuser avec un petit sarclet autour d'un vieux cep. Prélever des racines chevelues un peu brunes. Les mettre dans de l'eau du robinet.

Pour les plantes en pot prendre les chevelues qui sont au centre du pot. Il ne faut pas prendre celles qui ont touché le pot ou celles qui sont en surface, car elles sont en contact avec l'air.

Ne pas prendre les grosses racines et les brunes foncées.



Couper d'abord (en serre ou sur place) les pointes des racines, puis couper les racines du centre et les mettre dans un pot avec de l'eau. Au labo, les reprendre une à une et les laver délicatement sous l'eau du robinet. Enlever les petites mottes de terre qui adhèrent aux

racines (il s'agit du mycélium extérieur des mycorhizes), couper les petites chevelues un peu brunes en tronçons de 1-2 cm et les remettre dans l'eau.

Il est préférable de blanchir et de faire la coloration immédiatement, au maximum dans un délai de 24h, sinon les mycorhizes sont détruites par les cellules.

Si cela n'est pas possible, mettre les racines dans de l'alcool 70° à température ambiante.

Dans des éprouvettes de minimum 10cm de haut, remplies au 2/3 avec du KOH 10%, mettre délicatement les racines. Fermer les tubes en faisant attention de ne pas fermer complètement les bouchons (→ risques que ça explose sous la pression...). Mettre au bain-marie à ~95°C° (**juste** avant ébullition et qqes bulles ça va) 30 min. Secouer le tube de temps en temps.

Refroidir le tube (pas brusquement), vider le KOH et les échantillons dans des coupelles puis les rincer 3 fois à l'eau du robinet. Remplir la coupelle avec de l'eau acétique 0,5% et laisser neutraliser le KOH le temps de rincer le tube avec l'eau du robinet ainsi qu'à l'eau acétique 0,5%.

Bien enlever l'eau acétique et remplir 1/3 du tube avec du colorant IDEAL dilué selon le mode d'emploi avec une concentration finale d'acide acétique de 1%.

Mettre au bain-marie à 93°C durant 10min.

Verser le colorant et les échantillons dans la coupelle et laver avec de l'eau acétique à 0,5%, changer l'eau acétique jusqu'à ce que les échantillons ne dégorgent plus. Si cela ne suffit pas, prendre de l'acide acétique 5% (ou de l'acide lactique 30%). On peut les conserver quelque de temps dans l'eau acétique.

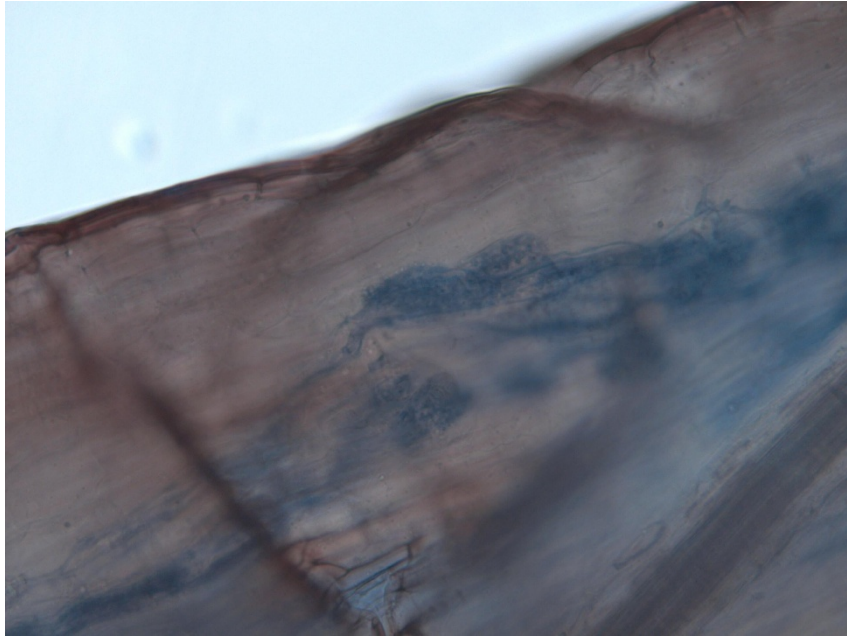
Pour l'encre éclaircir encore avec de l'acide lactique à 30%, puis revenir à l'acide acétique.

Monter les échantillons sur lame en les essorant sur un papier et les déposer sur une petite goutte de glycérol 70%. Couper avec une lame de rasoir si elles sont trop longues.

Poser une lamelle couvre-objet et appuyer avec un manche en bois pour écraser les racines si elles sont trop grosses. Attention de ne pas tout détruire. (Fermer le bord avec du vernis à ongle si on désire conserver la lame.)

Observer au microscope la partie de la racine qui se trouve entre le centre et l'écorce. On peut déjà repérer les hyphes et les corpuscules avec l'objectif 10x.

## Résultats



## Protocole de coloration de l'analyse N<sub>Min</sub>

### **Soil ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) determination using plate reader**

#### **Reagents**

1. 1M Potassium Chloride (KCl): Dissolve 74.59 g KCl in 1 liter water.
  - Make up according to sample number → 1L for roughly 30 samples
2. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> standard: Dissolve 4.719 g dry ammonium sulphate in 400 mL distilled water in a 1000 mL volumetric flask and make up to volume. Pipette 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 0.5, 1.0, 1.5mL of the stock solution into 100 mL volumetric flasks to give 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N L<sup>-1</sup>. Make up the volume with 1M KCl.
3. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> standard: Dissolve 7.218 g dry potassium nitrate in 600 mL distilled water dilute to 1000 mL. Pipette 0, 0.1, 0.20, 0.3, 0.40, 0,5 (0.60)mL of the stock standard solution into 100 mL volumetric flask and make the volume with 1M KCl. The resulting standard concentrations are 0, 1, 2, 3, 4, 5, (6) mg NO<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup>.
  - High concentrations lead to "OVERFLOW" error in instrument, thus only to 5 or 6 mg/L

#### For ammonia

4. Color reagent for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N: Dissolve 34 g sodium salicylate, 25 g sodium citrate, 25 g sodium tartrate in 750 mL distilled water. Add 0.12 g sodium nitroprusside, dissolve and make up to 1000 mL.
5. Alkaline hypochlorite solution: Dissolve 30 g sodium hydroxide in 750 mL distilled water. Add 10 mL sodium hypochlorite solution and make up to 1000 mL.

#### For nitrate

6. Vanadium chloride (VCl<sub>3</sub>) solution: 0.8 g vanadium (III) chloride in 50 mL of 1 M HCl (8.3 mL concentrated HCl to 100 mL water)
7. 2.0% sulfanilamide solution: 2 g sulfanilamide bring to 100 mL volume with 5% (v/v) HCl
8. 0.1% (w/v) NEDD (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride): 100 mg NEDD dissolve in water and bring volume to 100 mL

#### **Extraction of the soil samples with 1M KCl**

Weigh 20 g of field moist soil into a falcon tube and record the gravimetric moisture. Add 30 mL of 1M KCl and put samples on shaker for 30 min. After shaking take samples from shaker and let them settle for 30 min. Filter the supernatant through a 0.45 µm filter (syringe filter works well if only the supernatant is used) into a falcon tube. Store the extract in the cold room if not used the same da. Keep in mind that weighing the soil and filtering takes a lot of time.

## **Analysis**

### Procedure for ammonia

In a clear 96 well plate, add 50  $\mu$ L sample or standard to each well. Add 150  $\mu$ L salicylate solution to each well using the multichannel pipette. Add 150  $\mu$ L hypochlorite solution to each well using the multichannel pipette. Tap edge of plate to mix well and incubate for 50 min. Read plate at 650 nm.

### Procedure for nitrate

Premix solutions just prior to analysis to a ratio of 2:1:1 (20 mL VC13: 10 mL sulfanilamide: 10 mL NEDD). Add 100  $\mu$ L of premix solution to 100  $\mu$ L of sample or standard in 96 well plate.

Very often, the sample has to be diluted as the microplate reader can only read up to ca. 5 mg/l, for higher values there is not enough light going through the sample and that leads to “OVERFLOW/OVRFLW” error. Use 50  $\mu$ L of sample and 50  $\mu$ L of 1M KCl for a 1:2 dilution or 25  $\mu$ L of sample and 75  $\mu$ L of 1M KCl for a 1:4 dilution

The plate is incubated at 37°C for 60 min and measure absorbance at 540 nm.

## **Notes**

When processing high number of samples try to put everything into the same order as the samples will be in the well plate (i.e. put everything into columns of 8 samples). This will make the final pipetting of the samples easier and reduces errors.

## **References**

- Doane, T.A., and W.R. Horwath. 2003. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. *Analytical Letters*, 36(12): 2713-2722.
- Forster, J.C. 1995. Soil nitrogen. In: K. Alef and P. Nanniperi (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Chapter 3: Soil sampling, handling, storage and analysis, p. 79-116. Academic Press Inc., San Diego, CA.

### Protocole des analyses Biolog (Ecoplate)

- Peser 10 g de sol frais
  
- Ajouter 90 ml de solution de solution saline (0.85% NaCl, >> dilution = 10×)
  
- Shaker pendant 30 minutes à 150 RPM
  
- Laisser sédimenter 30 minutes
  
- Prendre 200 µl de surnageant avec la micropipette (≈1 cm de profondeur pour éviter de collecter des particules organiques en suspension) et ajouter à 19.8 ml de solution saline (0.85% NaCl, >> dilution = 100×)
  - NB dilution totale = 1000×
  
- mettre à incuber 150 µl dans chaque puits des microplate
  
- Lecture immédiate au microplate reader (measuring the intensity of the color change as a result of dye reduction-tetrazolium violet caused by micro reduction)
  
- Lectures après :≈ 120 h, ≈150 h, ≈180 h
  
- 2 corrections aux valeurs de densités optiques pour chaque substrat: valeur lue – valeur du contrôle (i.e. solution saline) – valeur de  $T_0$  du substrat
  
- Calcul des index : (i) diversité microbiologique et (ii) s'assurer que les valeurs plateaux sont atteintes (doivent être similaires pour les lectures après avoir atteint le plateau):
  - AWCD (average well color development) =  $\Sigma(n_i) / 31$ , where  $n_i$  is the absorbance of each substrate (Hu et al., 2011).
  
  - shannon index :  $H' = \Sigma P_i \ln(P_i)$ , "where  $P_i$  can be calculated by subtracting the control absorbance from each substrate absorbance and then dividing the value by the total color change for all 31 substrates"

→ McIntosh index:  $D = \frac{1}{\sum_0^i p_i^2}$ ,  $n_i$  is the metabolic activity on each substrate, and  $p_i$  is the ratio of  $n_i$  to the sum of activities on all substrates

→ Species richness of community  $U = \sqrt{\sum_0^i (n_i^2)}$

Longueurs d'ondes:

- 490 nm e.g. (Nagy et al. 2013)
- 590 nm e.g. (Zak et al. 1994 ; Hu et al., 2011).

### **References**

HU, Junli, LIN, Xiangui, WANG, Junhua, *et al.* Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, vol. 11, no 2, p. 271-280.