

Université de Montréal

**Comparaison des réponses de quatre espèces de saule à divers  
traitements d'inondation et de surfertilisation en azote**

*Par*

Camille Auger

Département de sciences biologiques | Institut de recherche en biologie végétale

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade  
de M.Sc. en sciences biologiques

Décembre 2021

© Camille Auger, 2021

Université de Montréal

Département de sciences biologiques, Faculté des arts et des sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Comparaison des réponses de quatre espèces de saules à divers  
traitements d'inondation et de surfertilisation en azote**

*Présenté par*

**Camille Auger**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Pierre-Luc Chagnon**

Président-rapporteur

**Michel Labrecque**

Directeur de recherche

**Joan Laur**

Codirectrice

**Yves Comeau**

Membre du jury

## Résumé

Mon travail de maîtrise a été réalisé dans le cadre du projet PhytoVaLix, un projet de recherche qui réunit des chercheurs de l'Université de Montréal et des entreprises privées. Le but de ce projet est de développer une technologie de phytotraitement de lixiviat provenant de lieux d'enfouissement technique à l'aide de saules pour remplacer les techniques conventionnelles. Une plantation filtrante de saule miyabeana (*Salix miyabeana*) est présentement en place sur le site expérimental. Les saules y sont arrosés avec du lixiviat afin qu'ils utilisent l'azote ammoniacal, le polluant principal, pour leur croissance. Dans mon étude, je me suis intéressée aux réponses morphologiques et physiologiques développées par quatre espèces de saule lorsqu'elles sont soumises à divers traitements combinant l'inondation et la surfertilisation à l'azote. L'étude avait comme objectif de comparer le potentiel de ces espèces pour la phytoremédiation d'eau azotée et de deux méthodes d'application du lixiviat. Les réponses à l'inondation et à la surfertilisation à l'azote furent variées et en révèlent beaucoup sur les stratégies adoptées par chacune des espèces. La biomasse de *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* et *S. nigra* ne fut pas impactée par les traitements de lixiviat, alors que *S. bebbiana* a grandement souffert des périodes d'inondation. Les espèces indigènes *S. nigra* et *S. amygdaloides* se sont positivement démarqués quant à leur capacité à retirer l'azote du lixiviat (>75 kg/ha). Il serait pertinent de continuer à faire des recherches sur celles-ci dans le but de les utiliser dans des projets où le phytotraitement du lixiviat et la biodiversité vont de pair.

**Mots-clés** : *Salix*, phytoremédiation, lixiviat, inondation, azote, écophysologie

## Abstract

My master's work was done within the context of the PhytoVaLix project, a research project that brings together researchers from the Université de Montréal and private companies. The goal of this project is to develop a technology for the phytotreatment of leachate from engineered landfill sites using willows to replace conventional techniques. A filtering plantation of miyabeana willow (*Salix miyabeana*) is currently in place on the experimental site. The willows are watered with leachate so that they use ammoniacal nitrogen, the main pollutant, for their growth. In my study, I focused on the morphological and physiological responses developed by four willow species when subjected to various treatments combining flooding and nitrogen overfertilization. The study aimed to compare the potential of these species for nitrogenous water phytoremediation as well as two leachate application methods. Responses to flooding and overfertilization with nitrogen varied and reveal much about the strategies adopted by each species. The biomass of *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* and *S. nigra* was not impacted by the leachate treatments, while *S. bebbiana* suffered greatly from the flooding periods. The native species *S. nigra* and *S. amygdaloides* positively stood out in their ability to remove nitrogen from leachate (>75 kg/ha). It would be relevant to continue research on these two with the aim of using them in projects where leachate phytotreatment and biodiversity go hand in hand.

**Keywords** : *Salix*, phytoremediation, leachate, flooding, nitrogen, ecophysiology

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements .....	xi
Chapitre 1 – Introduction .....	13
1.1. Mise en contexte de l’expérience .....	13
1.2. Impact du lixiviat sur l’environnement .....	14
1.3. Méthodes traditionnelles de décontamination du lixiviat.....	15
1.4. Phytoremédiation.....	15
1.5. Problématique.....	16
1.6. Revue de littérature .....	17
1.6.1. Réponses des saules à l’inondation .....	17
1.6.2. Réponses des saules à la surfertilisation à l’azote.....	19
1.6.3. Sélection de saules.....	20
1.7. Objectifs et hypothèses.....	24
1.7.1. Objectifs de la recherche.....	24
1.7.2. Hypothèses .....	25
Chapitre 2 – Comparison of the responses of four willow species to various flooding and nitrogen over-fertilization treatments .....	29

2.1. Abstract.....	30
2.2. Introduction .....	31
2.3. Material and method.....	34
2.3.1. Species selection .....	34
2.3.2. Experimental design and treatments .....	34
2.3.3. Data collection .....	35
2.3.4. Data analysis .....	36
2.4. Results.....	38
2.4.1. Plant growth response to flooding and overfertilization .....	38
2.4.2. Plant biomass and root-to-shoot ratio changes in response to flooding and overfertilization .....	39
2.4.3. Leaf, stomata and plant morphological responses to flooding and overfertilization	41
2.4.4. Willow filtration potential .....	45
2.5. Discussion .....	48
2.5.1. Impact of leachate irrigation on willow cuttings .....	48
2.5.2. Phytotreatment with indigenous willow species.....	50
2.5.3. Leachate application strategy and environmental applicability.....	50
2.6. Conclusion.....	51
Chapitre 3 – Conclusion générale et perspectives.....	53
3.1. Retour sur les objectifs et les hypothèses.....	53
3.1.1. Retour sur l’objectif et l’hypothèse 1.....	53
3.1.2. Retour sur l’objectif et l’hypothèse 2.....	55
3.1.3. Retour sur l’objectif et l’hypothèse 3.....	56

3.2. Perspectives ..... 57

Références bibliographiques ..... 59

Annexe 1 - Supplementary material..... 73

Annexe 2 – Tea bag index ..... 75

## Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques taxonomiques des saules inclus dans l'étude.....	24
Tableau 2. Characteristics of the five treatments of the experiment.....	35
Tableau 3. Mean values and standard deviation for root-to-shoot ratio of the four willow species according to the different treatments. ....	40
Tableau 4. Mean values and standard deviation for leaf, stomata and plant morphological responses of the four willow species according to the different treatments.....	43
Tableau 5. Mean values and standard deviation for leaf macroelement concentrations of the four willow species according to the different treatments.....	46
Tableau 6. Mean values and standard deviation of total amount of foliar nitrogen removal (kg/ha) envisioned for the four willow species according to the different treatments.....	47
Tableau 7. Leachate and substrate properties at the end of the experiment.....	47
Tableau 8. Mean values and standard deviation for aerial and roots biomass of the four willow species according to the different treatments.....	74
Table 9. Stabilization factor for the different treatments of the experiment.....	75



## Liste des figures

Figure 1. Changes in mean height of each willow species for each treatment during the six-weeks experiment.....	39
Figure 2. Dry Biomass of the four willow species under the five experimental treatments.....	40
Figure 3. Growth of the four willow species under the five experimental treatments.....	73

## Liste des sigles et abréviations

ANOVA : Analyse de la variance

*et al.* : *et alii* « et les autres »

ICP : Inductively Coupled Plasma

LET : Lieu d'enfouissement technique

MELCC : Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques

Mg : Magnésium

PFS : Plantation filtrante de saules

S : Stabilization Factor

SFS : Surface foliaire spécifique

SLA : Specific Leaf Area

SRC : Short Rotation Coppice

TBI: Tea Bag Index

WC: Water Content

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de recherche Michel Labrecque et Joan Laur. Merci de m'avoir soutenue dans ce projet et de m'avoir conseillée malgré les hauts et les bas de la pandémie... Merci Joan pour ton écoute, ton humour et ton œil critique. Merci Michel pour ta confiance, ta sagesse et la Mikemobile!

Caroline Susini, ma française préférée. Merci d'avoir ensoleillé chacune de mes journées, même celles où la sueur et la bouette étaient au rendez-vous. Merci d'avoir travaillé avec moi, cette collaboration fut un succès et je retravaillerais avec toi n'importe quand.

Merci à la gang du tunnel : Hamida, Patrick, Benoit, Louis, Julien et Olivier. Je connais des saules qui seraient morts de soif sans vous, et un été qui aurait été beaucoup moins joyeux. Merci également à Pierre-Luc Chagnon et Frédéric Pitre pour votre encadrement lors de mon comité-conseil.

Merci à tous mes collègues des laboratoires Laur et Labrecque. La pandémie aura fait en sorte que nous aurons peu eu la chance de se côtoyer, mais je garde tout de même un bon souvenir des quelques mois passés ensemble à l'IRBV.

Finalement, merci à mon copain, Alexis. Tu as toujours été là pour moi à chacune des étapes, tu m'as épaulée dans chacune de mes décisions et tu as su m'encourager à chaque fois que j'en avais besoin. Merci de m'avoir suivi à Montréal et de m'avoir acheté une quantité incommensurable de sacs de chips.



# Chapitre 1 – Introduction

## 1.1. Mise en contexte de l'expérience

Mon travail de maîtrise a été réalisé dans le cadre du projet PhytoVaLix. Ce projet, qui s'est amorcé en 2018, résulte d'un partenariat entre l'Institut de recherche en biologie végétale (IRBV), Polytechnique, Ramo et Waste Management. L'objectif général de PhytoVaLix est de développer une technologie utilisant des saules pour biofiltrer des lixiviats provenant de lieux d'enfouissement technique (LET) tout en permettant la revalorisation de la biomasse végétale en fin de traitement. Plusieurs expériences et études ont eu lieu afin de déterminer les dimensions, les espèces végétales et les techniques de traitements à utiliser. Une plantation filtrante de saules (PFS) et un marais filtrant de saules (MFS) expérimentaux ont été mis en place afin de tenter de filtrer efficacement le lixiviat provenant de cellules d'enfouissement. Présentement, une PFS constituée de *Salix miyabeana* 'SX67' est établie sur un LET géré par la compagnie Waste Management. Il est situé à Sainte-Sophie (Québec, Canada). La PFS traite de façon efficace et à peu de coût de grandes quantités de lixiviat provenant du site.

La présente expérience avait pour objectif d'étudier les réponses et adaptations de quatre espèces de saule à l'inondation et à la surfertilisation à l'azote afin de connaître les caractéristiques des espèces de saule qui sont les mieux adaptées pour la biofiltration de lixiviat et de pouvoir utiliser ces caractéristiques pour pouvoir effectuer une présélection d'espèces lors de futurs projets. Les espèces de saule ont été sélectionnées afin d'obtenir un gradient de réponses aux traitements. Chaque espèce de saule a été soumise à quatre traitements combinant l'azote et l'inondation ainsi qu'à un traitement témoin. Parmi ceux-ci, un traitement cyclique a été expérimenté. Ce prototype d'application a comme objectif de limiter les effets délétères pour les saules de l'irrigation continue avec du lixiviat. Pour la sélection des saules, nous avons décidé de choisir des espèces indigènes au Québec, dont *S. nigra* qui aurait le potentiel d'être une espèce intéressante pour les projets de phytotraitement de lixiviat (Danielescu et al., 2020; Kang et al., 2008). Les capacités des espèces de saule de retirer l'azote du lixiviat dans les différents traitements ont été évaluées et comparées.

## 1.2. Impact du lixiviat sur l'environnement

Le lixiviat provenant des LET est produit lorsqu'un excès d'eau de pluie percole au travers des couches de déchets en décomposition. Les contaminants principaux retrouvés dans ce type de lixiviat sont: de la matière organique dissoute, des composés inorganiques, des métaux lourds et des composés organiques (Kjeldsen et al., 2002). Lors de la décomposition de la matière organique contenue dans le lixiviat, des acides aminés sont libérés suite à l'hydrolyse enzymatique des protéines par des micro-organismes aérobies et anaérobies (Burton & Watson-Craik, 1998). Une grande partie de ces acides aminés est assimilée par les microorganismes du sol pour leur croissance. Toutefois, dans le cas du lixiviat provenant des LET, la trop grande quantité de matière organique fait en sorte qu'un mélange d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) provenant de l'ammonification de l'azote excédant est produit.

Le gouvernement du Québec, dans le Règlement sur l'enfouissement et l'incinération de matières résiduelles, stipule que les lixiviats et les eaux recueillies par un LET ne peuvent pas être rejetés dans l'environnement s'ils dépassent la valeur limite de 10 mg N/L d'azote ammoniacal (MELCC, 2020). En effet, le rejet de trop grandes quantités d'azote dans l'environnement peut avoir des effets négatifs sur celui-ci, comme l'acidification des sols et la contamination des sources d'eau souterraines (Jones et al., 2006; Sainju et al., 2020). Les quantités d'azote ammoniacal contenues dans le lixiviat sont très variables d'un site à l'autre et même à l'intérieur d'un même site (Jones et al., 2006). Toutefois, pour donner une idée de grandeur, les lixiviats provenant de LET peuvent contenir plus de 1000 mg N/L d'azote ammoniacal (Renou et al., 2008). Il est donc essentiel de traiter ce lixiviat afin de, non seulement répondre aux normes environnementales, mais également dans le but de protéger l'environnement et la population.

### **1.3. Méthodes traditionnelles de décontamination du lixiviat**

Plusieurs méthodes de décontamination du lixiviat existent déjà et sont utilisées un peu partout dans le monde. Leur taux d'efficacité et les coûts reliés à leur utilisation varient grandement selon la méthode et le type de contaminant. Les méthodes peuvent être divisées en deux catégories: les méthodes biologiques et les méthodes chimiques et physiques (Wiszniowski et al., 2006). Les méthodes biologiques impliquent la croissance de microorganismes qui vont utiliser les composantes du lixiviat pour leur croissance ou bien les transformer en gaz. Ces méthodes sont peu coûteuses et sont efficaces en termes de nitrification/dénitrification. Toutefois, les lixiviats contiennent souvent des contaminants toxiques et des composés organiques réfractaires qui impactent l'efficacité du processus de ce type de méthode (Sainju et al., 2020). Les méthodes chimiques et physiques peuvent être adaptées en fonction des contaminants retrouvés dans le lixiviat mais, sont très coûteuses (Wiszniowski et al., 2006). Comme plusieurs centaines de mètres cubes de lixiviat sont produites à chaque jour, ce type de méthode n'est pas économiquement viable. Diverses combinaisons des deux types de méthodes constituent, pour l'instant, les meilleures façons de traiter le lixiviat (Stegmann, 2005).

### **1.4. Phytoremédiation**

La phytoremédiation est une technique utilisant les plantes et leurs microorganismes associés afin de décontaminer les sols et les eaux (Pilon-Smits, 2005). Différents procédés peuvent être utilisés par les plantes pour stabiliser, extraire, dégrader ou volatiliser les polluants auxquels elles sont exposées. Cette approche non conventionnelle de traiter les polluants est plus économique et demande de moins grosses dépenses d'énergie que les techniques d'ingénierie habituellement utilisées (Börjesson & Berndes, 2006; Pilon-Smits, 2005; Rosenqvist & Ness, 2004).

L'utilisation de végétaux permet à la fois de biofiltrer le lixiviat provenant des LET et de limiter la décharge d'azote dans l'environnement (Börjesson & Berndes, 2006). Ainsi, l'azote contenu dans le lixiviat est utilisé par les plantes pour leur croissance. La phytoremédiation du lixiviat permet de favoriser le recyclage du nutriment et de le remettre en circulation dans le cycle de l'azote via la promotion de la dénitrification par les racines (Jones et al., 2006; Qasim & Chiang, 1994). Aussi,

via la transpiration, les plantes relâchent dans l'atmosphère l'eau qu'elles absorbent, permettant ainsi de réduire le volume du lixiviat (Gardner & Ehlig, 1963).

Les saules (*Salix* spp.) sont des plantes ligneuses plutôt populaires pour les projets de phytotraitement de lixiviat et d'eaux usées (Aronsson & Bergström, 2001; Cureton et al., 1991; Dimitriou et al., 2006; Justin et al., 2011). En effet, diverses caractéristiques font en sorte que ce sont les candidats idéaux pour ces projets. Parmi celles-ci, on note: leur taux d'évapotranspiration élevé, leur capacité d'absorber une vaste gamme de polluants, leur croissance rapide, leur tolérance à l'inondation, leur facilité d'établissement et le peu d'entretien nécessaire (Corseuil & Moreno, 2001; Frédette, Comeau, et al., 2019; Frédette, Labrecque, et al., 2019; Grenier et al., 2015; Guidi Nissim et al., 2014; Kuzovkina et al., 2008; Kuzovkina & Volk, 2009). Les projets de phytoremédiation de lixiviat utilisant les saules sont de plus en plus nombreux puisque le nombre de plans d'eau affectés par ce type de pollution est grandissant (Bialowiec et al., 2003; Frédette, Grebenshchikova, et al., 2019; Lévesque et al., 2017).

## **1.5. Problématique**

De grandes quantités de déchet sont enfouies chaque jour partout dans le monde, conséquemment de grandes quantités de lixiviat sont produites et nécessitent d'être traitées. De plus, des sites fermés depuis plus de 100 ans produisent encore des quantités considérables de lixiviat (Jones et al., 2006). Il est donc important d'avoir un système efficace pour traiter de gros volumes de lixiviat sur un espace le plus restreint possible. Un des facteurs pouvant limiter l'établissement potentiel d'une plantation de saules arrosée au lixiviat provenant de LET est la présence élevée de nutriments et de contaminants. Il est donc important de contrôler la quantité de lixiviat à laquelle les saules sont exposés afin de ne pas nuire à leur développement. De plus, lorsque l'on augmente le volume de lixiviat avec lequel les saules sont irrigués, la quantité d'eau apportée peut excéder leurs besoins. Les saules sont, pour la plupart, des arbres ou des arbustes s'établissant dans les sols humides ou inondés (Isebrands & Richardson, 2013). La présence d'eau est même nécessaire à la germination des graines de plusieurs espèces du genre *Salix* (Kuzovkina et al., 2008). Toutefois, une quantité importante d'eau pendant une longue période de temps pourra avoir des conséquences néfastes sur les saules (Kuzovkina et al., 2004). Les différentes



espèces de saule ont des capacités variables à s'adapter à des inondations. Les espèces s'adaptant le mieux à des conditions hydriques difficiles sont davantage à considérer dans les projets de phytotraitement puisque l'on pourra maximiser la quantité de lixiviat traité.

Comme on souhaite récolter la biomasse des saules et l'utiliser dans des projets de revalorisation à la suite de quelques années de croissance, on cherche également à maximiser leur production de celle-ci, particulièrement celle aérienne.

## **1.6. Revue de littérature**

### **1.6.1. Réponses des saules à l'inondation**

La principale contrainte imposée aux plantes soumises à l'inondation concerne la diffusion des gaz qui est plus lente dans l'eau que dans l'air. Ainsi, en période d'inondation prolongée, les échanges gazeux sont réduits entraînant une diminution de l'O<sub>2</sub> cellulaire ce qui peut restreindre la respiration aérobie de la plante (Bailey-Serres & Voesenek, 2008) et par le fait même la fixation de carbone ainsi que la croissance et la production de biomasse des saules (Luo et al., 2009; Nixon et al., 2001). De plus, comme l'activité de certains microorganismes du sol continue même dans le sol inondé, la concentration en O<sub>2</sub> diminue davantage et celle du CO<sub>2</sub> augmente. La lente diffusion des gaz dans l'eau contribue également à l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans le sol qui ne peut être évacué aussi efficacement (Greenway et al., 2006). Une trop grande concentration de ce gaz dans le substrat peut s'avérer toxique pour certaines espèces de plantes (Boru, 2003).

La faible concentration d'oxygène disponible dans le sol va également entraîner une diminution du potentiel d'oxydoréduction (Eh) (González-Méndez et al., 2017). Un Eh bas cause un stress supplémentaire aux racines qui, pour les plantes non adaptées aux milieux inondés, deviennent dysfonctionnelles et ont alors de la difficulté à absorber correctement les macronutriments (Kozlowski, 1997; Pezeshki, 2001). L'absorption de l'eau est aussi réduite lorsque les racines sont endommagées avec pour conséquence une diminution du potentiel hydrique des feuilles et la probable fermeture des stomates afin de limiter la transpiration et donc également la conductance stomatique et le taux de photosynthèse (Pezeshki et al., 1996; Pezeshki, 2001; Rood

et al., 2010). Toutefois, pour certaines espèces tolérantes aux inondations, les stomates peuvent réouvrir après un certain temps (Kozlowski, 1984).

Les plantes vivant dans des substrats saturés en eau ont développé plusieurs adaptations afin de résister à l'anoxie provoquée par la lente diffusion des gaz. Ces adaptations peuvent être de types morphologiques, anatomiques, métaboliques et physiologiques. Certaines espèces de saule vont développer des lenticelles hypertrophiées, des tissus aërenchymes, des racines adventives ou encore des racines à gravitropisme négatif (verticales) pour augmenter leurs échanges gazeux (Jackson & Attwood, 1996; Kuzovkina et al., 2004; Li et al., 2006; Pezeshki et al., 1996). Ces adaptations diffèrent selon le génotype, la durée et la fréquence du stress et la profondeur de l'eau (Doffo et al., 2017; Li et al., 2004; Rodríguez et al., 2018). Certaines adaptations vont survenir après la fin de l'inondation. Celles-ci servent à ce que la plante se rétablisse des dommages causés par l'eau et se prépare aux prochaines inondations. On peut observer, par exemple, une élongation des racines pendant la période sèche et une augmentation des réserves de carbohydrates (Jackson & Attwood, 1996; Wang et al., 2017).

Deux types de stratégies ont été observés chez les plantes tolérantes aux inondations. La première implique la réduction du métabolisme et de la croissance afin de conserver l'énergie et les ressources comme les carbohydrates. La deuxième consiste en une augmentation de la croissance des parties aériennes afin d'éviter la submersion complète (Colmer & Voesenek, 2009; Voesenek & Bailey-Serres, 2015). Dans l'étude de Rodríguez et al. (2018), la première de ces stratégies semble avoir été adoptée par les espèces de saules utilisées. En effet, les chercheurs ont observé que la quantité d'azote par surface foliaire ainsi que la surface foliaire spécifique (SFS) augmentaient chez les saules soumis aux inondations. Il a été hypothétisé que les saules réagissaient ainsi dans le but de faciliter les échanges gazeux post-inondation et d'ainsi augmenter leur taux de photosynthèse. Des résultats similaires ont été observés par Fontana, Labrecque, Messier, et al. (2017) en plus de constater une diminution de la densité des stomates suivant l'augmentation de la SFS.

### **1.6.2. Réponses des saules à la surfertilisation à l'azote**

En plus d'avoir une capacité d'absorption de l'azote très élevée, les saules contribuent à la dénitrification dans la rhizosphère (Aronsson & Perttu, 2001). Le taux d'absorption de l'azote varie selon l'espèce de saule (Adegbidi et al., 2001). Plusieurs études ont montré les effets positifs de l'irrigation au lixiviat contenant une grande quantité d'azote sur la production de biomasse des saules et l'efficacité de ces plantes à capter l'azote (Adegbidi et al., 2001; Aronsson & Bergström, 2001; Guidi Nissim & Labrecque, 2010; Justin et al., 2011).

Il est suggéré d'utiliser une concentration de 45 à 150 kg d'azote par hectare par an afin d'optimiser le rendement de nombreuses espèces de saules tout en limitant le ruissellement de ce nutriment dans les milieux naturels (Fabio & Smart, 2018).

Une trop grande quantité d'azote peut avoir comme effet d'acidifier le sol par le processus de nitrification (Song et al., 2016) ainsi que par la relâche de protons par les plantes pour la conservation de l'équilibre des charges lors de leur absorption de  $\text{NH}_4^+$  (Bolan et al., 1991). Une baisse du pH entrainera une diminution de la capacité d'échange cationique (Barak et al., 1997). Il sera donc plus difficile pour les plantes d'absorber des cations tels le calcium, le potassium et le magnésium. Ainsi, un apport en azote supérieur à ce que les saules sont capables d'absorber pourrait avoir des effets négatifs sur leur développement.

La concentration foliaire en azote est un indicateur de la capacité du saule à absorber celui-ci (Simon et al., 1990). L'efficacité d'un saule à absorber l'azote sera également reflétée par sa biomasse (Fabio & Smart, 2018).

Comme discuté dans la section précédente, certaines espèces de saule, en réaction à des inondations, vont augmenter la quantité d'azote dans leurs feuilles ce qui favorisera une meilleure photosynthèse post-inondation (Rodríguez et al., 2018). Une fertilisation en azote des saules inondés pourrait donc leur permettre d'augmenter ces réserves et de mieux se rétablir suite à l'inondation. De plus, Liu et Dickmann (1993) ont constaté qu'un surplus d'azote a permis de diminuer les effets négatifs de l'inondation sur la photosynthèse et sur la conductance stomatique de deux espèces de peupliers. Dans une autre étude sur les mêmes espèces, les deux auteurs sont arrivés à la conclusion que l'addition d'azote a très peu d'effet sur la biomasse

racinaire, mais stimulerait la biomasse foliaire (Liu & Dickmann, 1992). L'étude de Lower et Orians (2003) a également démontré que l'addition de nutriments, dont de l'azote, augmente la croissance de *Salix sericea* et la concentration d'azote dans les feuilles en milieu inondé. Toutefois, le traitement d'inondation aurait davantage de conséquences délétères sur le développement des racines même si une forte application d'azote encouragerait la production de racines fines.

### **1.6.3. Sélection de saules**

L'effet de l'inondation sur les saules est un sujet très bien étudié (Doffo et al., 2017; Kozlowski, 1984; Kuzovkina et al., 2004; Li et al., 2006; Lodge, 1989; Rood et al., 2010), puisque les espèces de cette famille sont typiques des milieux humides (Isebrands & Richardson, 2013). De plus, leur utilisation dans les projets de restauration de rives et de phytoremédiation permet d'avoir une bonne idée de leurs réponses associées à un sol saturé en eau. Toutefois, très peu d'études semblent avoir été réalisées afin de comprendre les processus physiologiques engendrés par l'ajout de fertilisant azoté à un traitement d'inondation comme c'est le cas lors de la biofiltration de lixiviats. Dans le but de mieux comprendre les différentes réponses possibles à l'inondation et au traitement à l'azote, quatre espèces de saules ont été sélectionnées selon différents critères. Tout d'abord, comme le projet s'insère dans le cadre de PhytoVaLix, il était essentiel de choisir l'espèce présentement utilisée pour le phytotraitement du lixiviat, soit *S. miyabeana*. Toutefois, vu les disponibilités et les contraintes imposées par la situation de la pandémie mondiale engendrée par la COVID-19, le cultivar choisi 'SX64' était différent, mais génétiquement très près de celui utilisé sur le site de Sainte-Sophie ('SX67'). Nous avons ensuite voulu intégrer des espèces indigènes au Québec afin de comparer entre elles et avec l'espèce utilisée à Sainte-Sophie leur capacité à biofilter le lixiviat. Finalement, nous désirions obtenir un gradient de réponses variées aux inondations et aux contaminants afin de pouvoir comparer les caractéristiques morphologiques et physiologiques et de mieux comprendre comment les saules tolèrent les inondations et les apports importants en azote et s'adaptent à ces conditions.

### ***Salix miyabeana* 'SX64'**

Le saule miyabeana (*Salix miyabeana*) est une espèce originaire d'Asie (Isebrands & Richardson, 2013). Certains cultivars de l'espèce, tels 'SX61', 'SX64' et 'SX67', ont déjà été à maintes reprises utilisés dans divers projets de phytoremédiation en Amérique du Nord (Courchesne et al., 2017; Guidi Nissim et al., 2014; Mirck & Volk, 2010). Le saule miyabeana se trouve typiquement dans les milieux humides tels les prairies humides, les rives de rivières et les plaines d'inondations (Isebrands & Richardson, 2013). L'espèce serait plutôt sensible à la sécheresse et plus productive dans les endroits humides (Fontana, Labrecque, Messier, et al., 2017).

Le saule miyabeana est une espèce de plus en plus étudiée et utilisée dans les projets de plantation (Fontana, 2016; Guidi Nissim et al., 2013; Vermerris, 2008). Son haut taux d'évapotranspiration (Frédette, Grebenshchykova, et al., 2019), sa grande capacité de production de biomasse (Labrecque & Teodorescu, 2005), sa tolérance aux contaminants (Frédette, Comeau, et al., 2019; Grenier et al., 2015) et sa capacité de rétention des nutriments (Guidi Nissim et al., 2014) en font une espèce de choix pour la phytoremédiation.

Le cultivar 'SX67' est d'ailleurs utilisé pour ces raisons dans le projet PhytoValix. Toutefois, comme précédemment expliqué, vu certaines contraintes liées à la disponibilité de boutures, un cultivar différent a été utilisé dans la présente étude. Des études ont déjà démontré la capacité de *S. miyabeana* à tolérer et à capter l'azote ammoniacal provenant du lixiviat (Guidi Nissim et al., 2014). Dans l'étude de Fontana, Labrecque, Collin, et al. (2017), il a été observé que la surface foliaire de *S. miyabeana* s'accroît avec l'augmentation de précipitation alors que la densité stomatique diminue. Le saule miyabeana est une espèce ayant naturellement des lenticelles pour l'aider dans ses échanges gazeux dans son milieu naturel qui est inondé (Cameron et al., 2010).

*S. miyabeana* est une espèce plutôt bien adaptée aux conditions pédoclimatiques du Québec (Labrecque & Lajeunesse, 2017). On s'attend donc à ce que cette espèce performe et s'adapte bien à tous les traitements d'inondation et de fertilisation en azote (tableau 1). Nous croyons que ce sera l'espèce qui démontrera le plus de réponses positives aux traitements comme le développement de racines adventives pour l'inondation, une augmentation de la biomasse, etc. Les autres espèces de l'expérience pourront être comparées avec celle-ci.

### ***Salix amygdaloides***

Le saule à feuilles de pêcher (*Salix amygdaloides*) est un arbre indigène du Québec qui tolère bien les sols humides ou inondés. On le retrouve typiquement dans les milieux humides et les rivages (Isebrands & Richardson, 2013). Toutefois, on rapporte que sa croissance racinaire peut diminuer dans les sols inondés (Kuzovkina et al., 2004). Dans cette même étude, les auteurs mentionnent que la croissance de racines flottantes et de racines adventives ainsi que l'hypertrophie des lenticelles de la tige sont des adaptations à l'inondation caractéristiques des saules à feuilles de pêcher. Son taux d'évapotranspiration est plutôt moyen en comparaison des autres saules étudiés dans la revue de littérature de Frédette, Labrecque, et al. (2019). On s'attend donc à ce que cette espèce démontre des réponses aux traitements d'inondation et soit en mesure de s'y acclimater.

Cette espèce de saule ne semble pas avoir été étudiée pour son habilité à résister à l'hyperfertilisation à l'azote. La présente étude permettra d'évaluer si l'espèce possède la capacité de s'adapter à de forte concentration d'azote (tableau 1). Le cas échéant, l'espèce pourrait être considérée pour de futurs projets de filtration de lixiviat.

### ***Salix bebbiana***

Le saule de Bebb (*Salix bebbiana*) est une espèce indigène au Québec qui se trouve presque partout dans l'hémisphère nord du globe. Cette espèce croît habituellement dans les environnements xériques tout particulièrement les lisières de forêts de feuillues (Isebrands & Richardson, 2013). Malgré le fait que le saule de Bebb soit très résistant à la sécheresse, on peut le retrouver dans des milieux plus humides. Dans l'étude de Timoney et Argus (2006), on décrit *S. bebbiana* comme une des espèces les plus affectées négativement par les inondations. On mentionne également que ce serait la seule espèce qui n'a pas produit de racines adventives. Toutefois, le saule de Bebb est une espèce qui possède de bonnes capacités de phytoremédiation pour les sols contaminés au pentachlorophénol et en arséniate de cuivre chromaté (Heine, 2018). *S. bebbiana* est également une espèce utilisée dans les projets de biomasse (Isebrands & Richardson, 2013). Dans la présente expérience, l'on s'attend à ce que *S. bebbiana* soit l'espèce la moins résistante aux inondations.

La résistance à l'hyperfertilisation à l'azote du saule de Bebb ne semble pas non plus avoir été étudiée. La présente étude permettra ainsi de déterminer les réponses de *S. bebbiana* aux traitements d'azote et si un apport en azote permet d'augmenter sa résistance aux inondations (tableau 1).

### ***Salix nigra***

Le saule noir (*Salix nigra*) est une espèce d'arbre indigène au Québec qui pousse bien dans les sols mal drainés ou inondés périodiquement (Conger, 2003; Isebrands & Richardson, 2013). Dans l'étude de Kuzovkina et al. (2004), on a observé que la croissance racinaire de l'espèce était même positivement impactée par l'inondation du sol. Les racines de *S. nigra* étaient plus grosses dans les traitements d'inondation que dans les traitements témoins (Kuzovkina et al., 2004). Les individus exposés aux traitements d'inondation ont aussi développé des racines adventives et des aerenchymes ainsi que des lenticelles hypertrophiées. Des résultats similaires ont été observés dans l'étude de Cerrillo et al. (2013), qui a montré que le saule noir résistait bien aux traitements d'inondation, c'est également l'espèce dont le ratio racines/parties aériennes et la croissance ont le moins diminué lorsqu'inondées.

L'étude de Li et al. (2006) rapporte une différence quant au développement de racines adventives lorsque les plantes étaient complètement submergées (inondation totale) versus des traitements où le niveau d'eau était sous la surface du substrat (inondation partielle) des saules noirs. Les résultats de l'étude semblaient indiquer que le saule noir aurait plus de facilité à s'adapter aux conditions d'inondation partielle que totale.

Finalement, le taux d'évapotranspiration du saule noir est considéré comme élevé (Frédette, Labrecque, et al., 2019). Il sera donc intéressant d'utiliser cette espèce dans l'étude afin d'observer les changements physiologiques qui ont éventuellement lieu selon la durée des périodes d'inondation. On s'attend à ce que cette espèce démontre des réponses morphologiques et physiologiques en lien avec les traitements d'inondation du sol. Le saule noir est une espèce utilisée dans plusieurs projets de restauration vu la facilité à le bouturer et sa capacité à capter les contaminants et à résister à l'inondation (Conger, 2003; Isebrands & Richardson, 2013; Pezeshki et al., 2007). Cependant, la résistance de *S. nigra* à la surfertilisation

à l'azote ne semble pas avoir été étudiée (tableau 1). Pourtant l'espèce serait potentiellement intéressante à utiliser dans les traitements de lixiviat vu ses capacités déjà connues à tolérer l'inondation et des contaminants autres que l'azote.

**Tableau 1. - Caractéristiques taxonomiques des saules inclus dans l'étude**

<b>Espèce</b>	<b><i>S. miyabeana</i> 'SX64'</b>	<b><i>S. amygdaloides</i></b>	<b><i>S. nigra</i></b>	<b><i>S. bebbiana</i></b>
Sous genre	<i>Vetrix</i>	<i>Protitea</i>	<i>Protitea</i>	<i>Vetrix</i>
Section	<i>Helix</i>	<i>Humboldtianae</i>	<i>Humboldtianae</i>	<i>Fulvae</i>
Résistance aux inondations	++	+	++	-
Résistance à une surfertilisation à l'azote ammoniacal	++	? (-)	? (+)	? (+)

++ = très bonne résistance, + = bonne résistance, - = mauvais résistance, ? (+) = résistance inconnue, mais supposée bonne, ? (-) = résistance inconnue, mais supposée mauvaise

## 1.7. Objectifs et hypothèses

### 1.7.1. Objectifs de la recherche

Dans le contexte du plus vaste projet PhytoValix qui s'intéresse à l'utilisation des saules pour biofiltrer des lixiviats issus de LET et à la valorisation de leur biomasse, les objectifs de la présente étude sont:

1. Évaluer l'impact des deux principales contraintes associées au biotraitement de lixiviat (inondation et surfertilisation à l'azote) sur la physiologie, la croissance et la santé de quatre espèces de saule.
2. Déterminer quelle espèce ou quelles espèces seraient la ou les meilleures pour le traitement de lixiviat de site d'enfouissement et les caractéristiques mesurables qui leur permettent de se démarquer.
3. Évaluer le potentiel de l'application cyclique (une semaine avec inondation et azote, et une semaine sans) du lixiviat pour son phytotraitement.



### 1.7.2. Hypothèses

Hypothèse 1: Selon nous, les trois espèces les mieux adaptées aux milieux humides vont démontrer de meilleures capacités pour s'adapter aux conditions d'inondation. Toutefois, il est attendu que les réponses diffèrent selon les espèces. Il est en est de même pour les traitements de surfertilisation à l'azote. *S. bebbiana*, *S. nigra* et *S. miyabeana* devraient bien s'y acclimater, mais les réponses risquent de varier et d'être plus extrêmes pour certaines espèces.

On s'attend à ce que *S. miyabeana* soit l'espèce qui subisse le moins d'impact négatif sur sa biomasse suivant l'application des traitements d'inondation et d'azote, suivi de *S. nigra*, puis de *S. amygdaloides* et finalement de *S. bebbiana* qui sera la plus impactée. À l'inverse, il est attendu que les espèces les moins impactées sur leur biomasse par les traitements soient celles démontrant le plus d'adaptations morphologiques et physiologiques (lenticelles, racines adventives, azote foliaire, etc.) et vice-versa.

*S. miyabeana* est déjà utilisé dans les projets de traitements de lixiviat et de production de biomasse. Cette espèce ne devrait donc pas présenter de diminution de biomasse à la suite des traitements. En fait, l'espèce pourrait même bénéficier de la présence d'eau et d'azote. On devrait pouvoir observer une bonne acclimatation à l'inondation et à la surfertilisation en azote. Les autres espèces de saule de l'expérience seront donc comparées à celle-ci quant à l'observation des réponses aux différentes conditions.

Pour *S. nigra*, il est bien connu que cette espèce s'adapte efficacement aux traitements d'inondations. Les effets négatifs de ces traitements sur la biomasse devraient donc être minimes et les réponses morphologiques et physiologiques nombreuses. Toutefois, la réaction de cette espèce aux traitements de surfertilisation à l'azote ne semble pas documentée. On s'attend tout de même à ce que *S. nigra* s'adapte bien à ces traitements vu sa grande plasticité, même si une diminution de la biomasse peut être à prévoir.

*S. amygdaloides* est une espèce qui s'adapte moins bien que *S. nigra* et *S. miyabeana* aux inondations. On peut donc prévoir une baisse de la biomasse lors de ces traitements. Toutefois, comme *S. amygdaloides* est une espèce typique des milieux humides, on s'attend à observer quelques réponses morphologiques et physiologiques à l'inondation. La résistance de cette

espèce à la surfertilisation à l'azote n'est pas connue. Comme l'espèce ne semble pas posséder de bonnes capacités d'adaptations aux contaminants, on s'attend à ce que les traitements à l'azote diminuent sa biomasse et que peu ou pas de réponses soient observées en réponse à cette contrainte.

Dans le cas de *S. bebbiana*, comme cette espèce est moins résistante aux inondations, sa biomasse sera affectée négativement par ce type de traitement. De plus, l'espèce ne devrait pas développer de réponses pour s'adapter à l'inondation. Toutefois, *S. bebbiana* a démontré, lorsqu'utilisé dans des projets de phytoremédiation une bonne capacité pour s'adapter à la présence de contaminants dans le sol. Il est donc possible que l'espèce puisse s'acclimater aux traitements de surfertilisation à l'azote, mais cela est incertain et le traitement risque tout de même d'affecter sa biomasse.

Hypothèse 2: Comme il est déjà utilisé pour des projets de phytotraitement de lixiviat et que ses capacités sont bien connues, *S. miyabeana* devrait être l'espèce la plus performante pour capter l'azote contenu dans le lixiviat. *S. nigra* devrait être la deuxième meilleure espèce pour cette fonction puisque, pour tolérer et s'adapter aux inondations, l'espèce augmentera la quantité d'azote dans ses feuilles. Elle risque donc de capter cet azote dans le lixiviat. On s'attend à la même chose de *S. amygdaloides*, mais à un moindre degré puisque l'espèce s'acclimate moins bien aux inondations. Quant à *S. bebbiana*, il risque d'être trop impacté négativement par la composante inondation pour réussir à capter efficacement l'azote contenu dans le lixiviat.

Hypothèse 3: Le traitement cyclique représente une alternative d'application qui a comme objectif de contrer les effets néfastes de l'inondation continue du sol. Cette interruption du traitement d'inondation et de surfertilisation à l'azote devrait permettre aux saules de mieux répondre à ces traitements. Face à ces traitements, les saules devraient donc démontrer davantage de réponses aux contraintes comme des lenticelles, des racines adventives, de l'azote foliaire, etc. Aussi la biomasse des saules soumis à ces traitements devrait être moins négativement impactée que celle des saules dans les traitements où l'inondation et la surfertilisation à l'azote sont en continue. En effet, puisque les saules seront mieux adaptés et qu'ils auront une période sans contrainte, ils pourront mieux croître lors de ces périodes.

Finalement, comme les saules seront mieux adaptés et auront une meilleure croissance dans les traitements cycliques, ceux-ci devraient aussi pouvoir capter davantage d'azote du lixiviat dans ce traitement.



# **Chapitre 2 – Comparison of the responses of four willow species to various flooding and nitrogen over-fertilization treatments**

Camille Auger, Caroline Susini, Joan Laur, Michel Labrecque

Institut de recherche en biologie végétale

4101 rue Sherbrooke Est

Montréal (Québec, Canada)

H1X 2B2

Article en préparation pour soumission dans une revue avec comité de lecture.

## 2.1. Abstract

As the waste from engineered landfills decomposes, it produces a leachate highly charged with nitrogen that cannot be directly released into the environment. Plants like willows have the potential to phytofiltrate such pollutant. However, they must be able to tolerate large loads of nitrogen and to support flooding conditions. *Salix miyabeana*, a willow species native to Asia, has already proven to be efficient for phytoremediation. However, native willow species may be just as effective as selected cultivars to treat leachate, while contributing to the biodiversity of the site. In addition to *S. miyabeana* 'SX64', indigenous *S. amygdaloides*, *S. bebbiana* and *S. nigra* were tested in this experiment. An experiment carried out in containers was conducted to test the impact of diverse treatments of nitrogen overfertilization and flooding on these four willow genotypes. The objectives were to verify their ability to tolerate these constraints as well as to remove nitrogen from the leachate over a period of six weeks. Different leachate application protocols were also successfully tested without deleterious consequences. Overall, biomass and growth of *S. nigra* and *S. amygdaloides* were not affected by the treatments. *Salix nigra* demonstrated the ability to remove more than 60 kg of N per hectare per growing season. In comparison, *S. miyabeana* was ten times less efficient to remove nitrogen from leachate. Thus, we think that the capacities of *S. nigra*, *S. amygdaloides* and other indigenous species should be further studied in long-term field trials in order to be used in full-scale innovative leachate phytotreatment plants.

## 2.2. Introduction

Each year, five million tons of residual material are sent to engineered landfills in Quebec, Canada (Recyc-Québec, 2018). Rainwater percolates through the waste layers, becomes loaded with contaminants and forms what is called leachate, a liquid rich in a large quantity of dissolved organic matter, organic and inorganic compounds, and also heavy metals (Kjeldsen et al., 2002). The decomposition of the organic matter contained in the leachate leads to the release of nitrogen in the form of ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Burton and Watson-Craik, 1998). If essential for the growth of all plants, excessive nitrogen application can lead to nutrient imbalances and have negative consequences on the environment (Barak et al., 1997; Song et al., 2016). Yet, one way to treat leachate as an alternative to costly chemical processes, is to use phytofiltration plantations (Pilon-Smits, 2005). Plants used in such projects must be especially demanding in term of nitrogen and grow well in contaminated and water-saturated substrate as it is mostly the case of willow species (Kuzovkina et al., 2008) and especially those selected as high biomass producer for short rotation coppice (SRC) (Labrecque and Teodorescu, 2005).

As such, cultivars of *Salix miyabeana* are already used at pilot scale as part of an integrative experimental project on a technical landfill site at Sainte-Sophie (Quebec, Canada), which the present study is a part of. While such cultivars show strong tolerance to contaminants (Frédette, Comeau, et al., 2019; Grenier et al., 2015) and can be used in water phytoremediation projects (Guidi Nissim et al., 2014; Lévesque et al., 2017) because of their high evapotranspiration rate (Frédette, Comeau, et al., 2019) and nutrient retention capacity (Guidi Nissim et al., 2014; Jerbi et al., 2020), they originate from an exotic specie. Their use as a monoculture to treat leachate from engineered landfills fails somewhere to promote site biodiversity whereas a composite design including indigenous species may be envisioned. For example, while *S. nigra* is already used in restoration projects due to its ease of propagation and its ability to trap contaminants and resist flooding (Conger, 2003; Isebrands & Richardson, 2013; Pezeshki et al., 2007), the tolerance to permanent flooding (Kuzovkina et al., 2004) and to pollutant of *S. amygdaloides* is still relatively unknown though it is also a typical wetland species in Canada (Isebrands & Richardson, 2013). Therefore, it would request much further investigation before its possible deployment on a commercial scale. On the other side of the spectrum, *S. bebbiana* shrub is

typically growing in more xeric environments like hardwood forest edges (Isebrands & Richardson, 2013). However, it has good phytoremediation capabilities (Heine, 2018) and is an interesting candidate to better compare the effects of flooding versus overfertilization with nitrogen.

In general, carbon fixation and plant biomass growth and production should be negatively impacted in the context of a permanently-flooded treatment plant (Luo et al., 2009; Nixon et al., 2001) that represents a relatively stressful environment. On one side, because nitrogen overload implied with leachate fertigation can acidify the substrate through nitrification (Song et al., 2016) and thus decreases soil cation exchange capacity making cations such as calcium, potassium and magnesium more difficult to absorb for plants (Barak et al., 1997); on the other side because substrate flooding leads to the reduction of soil ions (González-Méndez et al., 2017) which is damaging to plant roots that are then unable to properly absorb macronutrients and water (Kozłowski, 1997). Furthermore, gases diffuse more slowly through water than through air, the diffusion of oxygen from a flooded soil to the plant cells is slowed, thus restricting aerobic respiration (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Consequently, we could expect the treatment of plants with leachate, i.e. nitrogen overfertilization and flooding to negatively impact plant overall physiology (reduction of leaf water potential, stomatal closure, decrease of stomatal conductance and photosynthetic rate; (Pezeshki, 2001; Pezeshki et al., 1996; Rood et al., 2010) and biomass production. However, several studies have already shown the positive effects of high nitrogen leachate irrigation on the performance of at least some willow species (Adegbidi et al., 2001; Aronsson & Bergström, 2001; Guidi Nissim & Labrecque, 2010; Justin et al., 2011) because of their high nitrogen absorption capacity and ability to promote denitrification of the rhizosphere (Aronsson and Perttu, 2001). In fact, several types of adaptations have also been observed in flood-tolerant willows like enlarged lenticels, floating or adventitious roots to facilitate gas exchanges otherwise limited by the flood (Jackson & Attwood, 1996; Kuzovkina et al., 2004; Li et al., 2006; Pezeshki et al., 1996). In the same way, the nitrogen concentration in leaf as well as the specific leaf area (SLA) can also be enhanced when plants are exposed to flooding (Rodríguez et al., 2018) in order to facilitate post-flood gas exchange and increase photosynthetic rate to



further compensate the negative impact of flooding (Rodríguez et al., 2018) in tolerant willow species.

In the context of the present study, all the above-mentioned parameters were investigated in order to better understand the physiological responses of four willow species to leachate treatments, i.e. nitrogen overfertilization and flooding, and their respective ability to phytofiltrate nitrogen contaminant under different leachate application protocols. The general hypotheses were that *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* and *S. nigra*, all recognised to naturally colonized wetlands, would perform well in the "flooding" treatment while *S. miyabeana*, *S. nigra* and *S. bebbiana* would benefit from the "nitrogen overfertilization" treatment. For all species, it is expected that they will perform better in the combined flooding and nitrogen treatments than when they are exposed to only one of the components. It is likely that the addition of nitrogen helps the willows to perform under flooded conditions, as the "flooding" treatment alone can cause nutrient leaching. Furthermore, the "cyclic" treatment, an alternation between flooded and dry periods, was expected to leverage plants the effect of permanent flooding.

## 2.3. Material and method

### 2.3.1. Species selection

Four willow species were chosen for the experiment. Three of them, *Salix miyabeana*, *S. nigra* and *S. amygdaloides* are known for their capacities to support flood conditions since they are naturally found in wetlands and flooded areas (Isebrands & Richardson, 2013). *Salix bebbiana* is a species rather found in xeric environments (Isebrands & Richardson, 2013) but was selected in order to compare its responses to those of other species better adapted to flooding conditions. Additionally, *S. miyabeana* has shown its ability to tolerate and capture ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) from leachate (Guidi Nissim et al., 2014). The tolerance to nitrogen overfertilization of the other three species has not been studied to our knowledge.

### 2.3.2. Experimental design and treatments

The experiment was conducted at the Experimental Growth Facility at the Montreal Botanical Garden (45°33'43.2"N; 73°34'18.0"W) in the tunnel greenhouse. Dormant cuttings (20-cm) of each willow species were obtained from Verbinnen's Nursery Ltd (Ontario, Canada). They were planted in plastic bags filled with a mix (1:1) of mature compost and BM6 potting soil (Berger, Quebec, Canada) to allow them to root. After 35 days, 120 willows (30 of each species) were transplanted into 12 L pots filled with plantation soil (Pepinière Mucci, Quebec, Canada).

A complete randomized block design with five treatments (including control) and the four willow species was set up and replicated in six blocks. Treatments (Table 2) began on June 18<sup>th</sup>, 2020, a week after transplantation, and lasted six weeks. All the pots containing willows were placed in large containers (40x60x36 cm) in order to carry out flood treatments. The willows not undergoing flood treatments were also placed in containers to standardize the design.

Flood treatments were done by filling the containers with water (up to 10-cm below soil surface) in order to maintain substrate saturation. Each willow receiving a nitrogen overfertilization treatment was exposed to a dose equivalent to 800 kg N/hectare/season in the form of an ammonium sulphate solution.

The "cyclic" treatment was applied over a two-week cycle. During the first week, the willows in this treatment were flooded and fertilized with nitrogen. The second week, the containers were emptied of their water and no nitrogen was applied. The removed water was stored in a cold room and reused to refill the containers the following week to keep applied nitrogen. The experiment lasted six weeks (3 cycles).

**Table 2. Characteristics of the five treatments of the experiment**

	<b>Control</b>	<b>Flooding</b>	<b>N overfertilization</b>	<b>Flooding + N overfertilization</b>	<b>Cyclic flooding + N overfertilization</b>
<b>Irrigation</b>	Regular watering	Permanent flooding	Regular watering	Permanent flooding	- Flooding <sup>1</sup> - Regular watering <sup>2</sup>
<b>Nitrogen fertilization</b>	None	None	Two times a week, 0.30 g/pot	Two times a week, 0.30 g/pot	- Two times a week, 0.60 g/pot <sup>1</sup> - None <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Parameter in place in week 1 of the cycle; <sup>2</sup> Parameter in place in week 2 of the cycle

### 2.3.3. Data collection

Morphological measurements including plant height, stomatal length and density, presence/absence of flood-related morphological features, total leaf area, water content, root dry weight and above-ground dry weight. The ratio between root and aboveground biomass (root to shoot ratio) was also measured.

From the start of the experiment and each week until the end, each willow was measured to assess plant height and growth. Growth was calculated by subtracting the initial height of each plant from its height at the end of the experiment.

At the end of the fourth week of the experiment, stomatal impressions were taken from the abaxial side of leaves of all individuals using clear nail polish and adhesive paper. One stomatal impression per plant was taken on a fully developed leaf. The stomatal impressions were then visualized with a light microscope (DM3000, Leica, Germany) at ×400 magnification and images of at least three field of view were recorded with a digital camera (DFC420C, Leica, Germany) to assess stomatal length and density (Fiji software, Schindelin et al., 2012).

Soil samples from each of the pots were also taken at the end of the fourth week to measure pH using a multimeter (Hanna HI98914, Hanna Instruments, Italy). The presence or absence of upward growing roots, adventitious roots and hypertrophied lenticels was noted during the last week of the experiment.

After six weeks of treatment, roots and aerial parts were harvested separately. Total leaf area was measured using a LI-3100C Area Meter. Biomass weight was measured after the entire root systems and aerial parts of all 120 plants were washed and oven-dried (70° C, 72 h). One leaf for each plant was weighted individually before being dried to determine the fresh weight. This leaf was then reweighed dried to determine the dry mass and thus calculate the leaf water content.

For nutrient content analysis sub-samples were sent to an external laboratory (Agroenvirolab, LaPocatière, Quebec, Canada, accredited by CEAEQ and ISO-CEI 17025). The foliar content of P, K, Ca, Mg, and S was analyzed by ICP-OES following the recommended methods in Quebec. The determination of total nitrogen was done by combustion analysis always following the methods recommended in Quebec.

Finally, samples of the water contained in the tanks (leachate) were taken at the very end of the experiment and sent to an accredited laboratory (H2Lab, Quebec, Canada) to measure total nitrogen following the recommended methods in Quebec.

The total amount of foliar nitrogen removal (kg/ha) envisioned for the four willow species according to the different treatments was calculated by multiplying the leaf dry weight by the percentage of leaf N. We then multiplied the result by 16,000, since this is usually the number of trees planted per hectare in SRC willow plantation, and then by three since the experiment lasted only 6 weeks, whereas a growing season lasts approximately 18 weeks.

#### **2.3.4. Data analysis**

Statistical analyses were performed using R version 3.6.3. The significance level of the analyses was set at  $\alpha = 0.05$ . Linear mixed models (nlme library) were built for each of the components under study. The "block" variable was used as a random intercept in all models. The "species" and "treatment" variables were used as fixed variables in all models. The significance of the

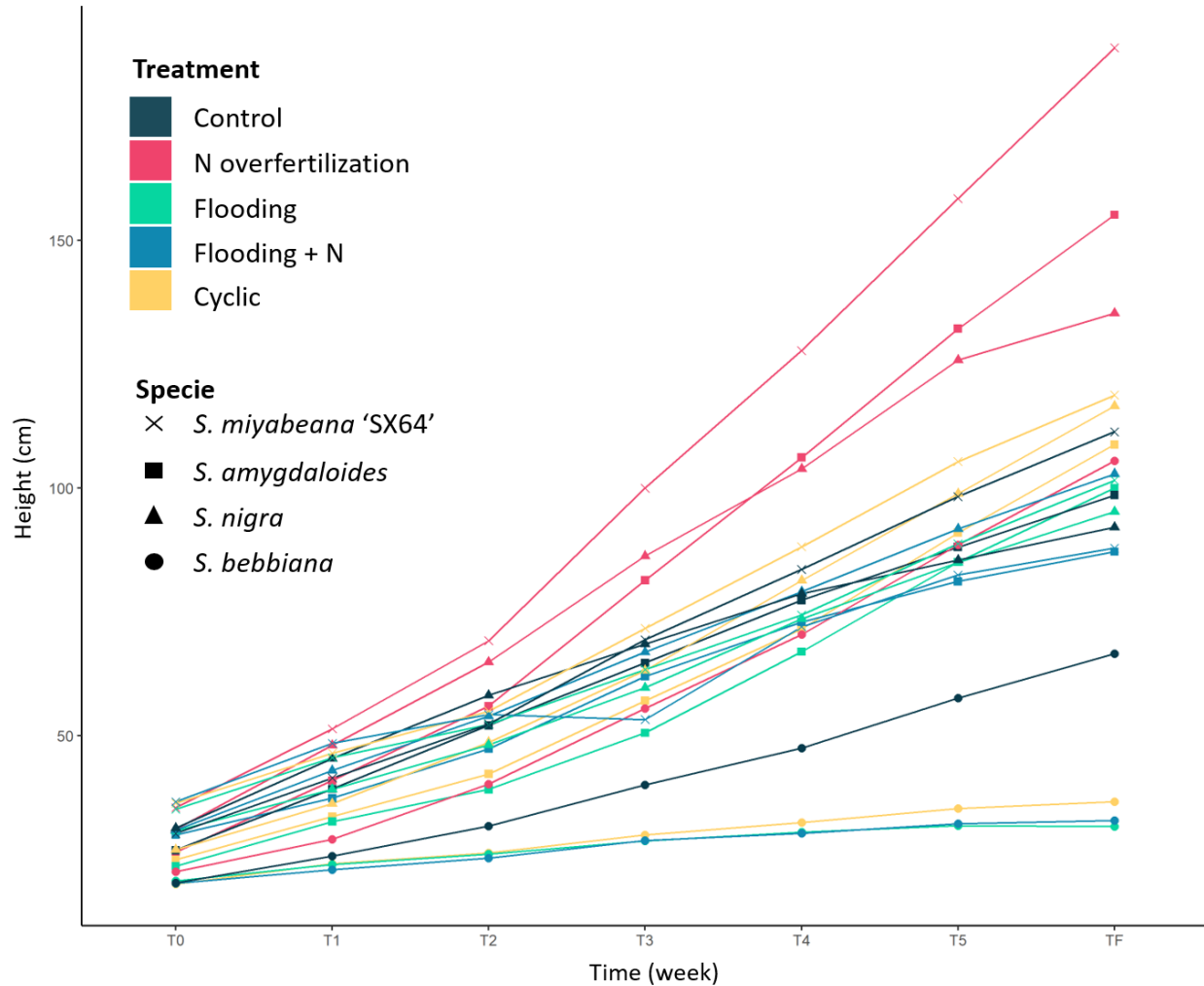
interaction was verified using ANOVA. The application conditions of all selected models were verified. The homoscedasticity, the linearity and the normality of the residuals were observed.

## 2.4. Results

### 2.4.1. Plant growth response to flooding and overfertilization

Among the different treatments, "nitrogen overfertilization" was the one that induced the greatest growth in height (Figure 1 and Figure 3 Supp.). Growth of *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* and *S. nigra*, in the "flooding" treatment did not significantly differ from "control". Furthermore, the addition of nitrogen to the flooding condition did not benefit the growth of the three above-mentioned species while flooding with or without nitrogen application negatively impacted the growth of *S. bebbiana* compared to "control" (Figure 1, bars on Figure 3 Supp.). Mean growth in height values for all species in the "cyclic" treatment were equal or greater to those measured for the two other treatments that included flooding.

Overall, *S. bebbiana* was the species with the lowest growth in height regardless soil conditions. For the "nitrogen overfertilization" treatment, *S. miyabeana* had the significantly greatest growth followed closely by *S. amygdaloides* and *S. nigra* while the later was the best performing species in the "flooding + N" treatment.

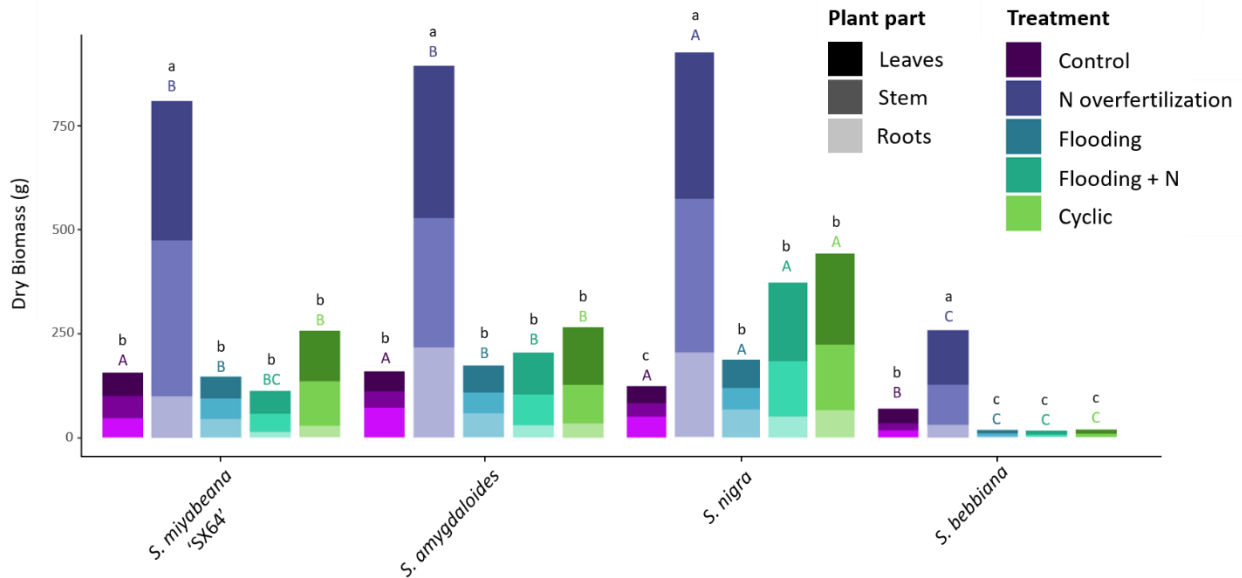


**Figure 1.** Changes in mean height of each willow species for each treatment during the six-weeks experiment.

#### **2.4.2. Plant biomass and root-to-shoot ratio changes in response to flooding and overfertilization**

The "nitrogen overfertilization" treatment increased the root, shoot and total biomass of all willow species (Figure 2), with *S. nigra* performing slightly better than *S. amygdaloides* and *S. miyabeana*. *S. bebbiana* produced few biomasses. Compared to "control", *S. nigra* plants grown under "cyclic" and flooding conditions with or without nitrogen performed better too in terms of total biomass. "Cyclic" conditions, and to a lesser extent "flooding + N", also benefit *S. nigra* and *S. amygdaloides* above-ground biomass compare to "control" or "flooding" but not root biomass as it is shown by the root-to-shoot data (Table 3 and 8 Supp.). Only the "cyclic"

benefited the above-ground biomass of *S. miyabeana* compared to the "control" and "flooding" treatments. Root biomass of *S. amygdaloides* and *S. nigra* was not impacted by the combined nitrogen and flooding treatments. Only the "cyclic" treatment had no significant impact ( $p>0.05$ ) on the root biomass of *S. miyabeana*, while the "flooding + N" treatment had a negative impact on it (Table 8 Supp.).



**Figure 2. Dry Biomass of the four willow species under the five experimental treatments.**

Note: Different letters indicate a significant difference between the biomasses at  $p<0.05$ . Different capital letters indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters indicate significant difference between treatments within the same species.

**Table 3. Mean values and standard deviation for root-to-shoot ratio of the four willow species according to the different treatments.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<i>S. miyabeana</i>	0.42 ± 0.11 aB	0.13 ± 0.03 bB	0.44 ± 0.09 aB	0.13 ± 0.06 bA	0.12 ± 0.03 bB
<i>S. amygdaloides</i>	0.81 ± 0.18 aA	0.30 ± 0.20 cA	0.49 ± 0.16 bAB	0.13 ± 0.10 dA	0.17 ± 0.05 cdA
<i>S. nigra</i>	0.70 ± 0.21 aA	0.28 ± 0.08 cA	0.57 ± 0.10 bA	0.13 ± 0.08 dA	0.18 ± 0.02 cdA
<i>S. bebbiana</i>	0.33 ± 0.05 aB	0.14 ± 0.02 cB	0.25 ± 0.06 bC	0.07 ± 0.05 dA	0.07 ± 0.06 dC

Note: Different letters indicate a significant difference between root-to-shoot ratios at  $p<0.05$ . Different capital letters (column) indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters (row) indicate significant difference between treatments within the same species.



*S. nigra* and *S. amygdaloides* had higher root-to-shoot ratio values than *S. miyabeana* (except for the "flooding +N") and than *S. bebbiana*. Treatments including nitrogen overfertilization led to lower root-to-shoot ratios in comparison to those without nitrogen ("control" and "flooding").

### **2.4.3. Leaf, stomata and plant morphological responses to flooding and overfertilization**

Leaf water content (WC) (Table 4) was significantly different between species and treatment except for *S. nigra* plants for which it remained steady (70% of fresh weight) regardless the treatment. For *S. miyabeana*, high WC was observed in plants growing under "nitrogen overfertilization" or "flooding" treatments, but not under "control" conditions or when both nitrogen and flooding factors were combined. For *S. amygdaloides*, leaf WC was significantly improved in presence of nitrogen with or without flooding. *S. bebbiana* leaf WC was substantially lower when the constraints were combined.

Variations in leaf area between treatments were very different between species (Table 4). Leaves of *S. miyabeana* submitted to the "nitrogen overfertilization" treatment was the only one to differ from others with a larger area. For *S. nigra*, the treatments containing nitrogen were also those with the highest leaf area regardless irrigation regime while the smallest leaf areas were observed in the "control" treatment. Leaves of *S. amygdaloides* were not different regardless of the treatment. Finally, the flooding treatments negatively impacted leaf area of *S. bebbiana*.

Despite that only stomatal data from *S. amygdaloides* and *S. nigra* could be collected since the images of *S. miyabeana* and *S. bebbiana* prints were not clear enough (Table 4), it allowed us to make comparisons between two riparian species. For *S. amygdaloides*, the stomatal opening of individuals in the "flooding" treatment were the greatest while those in the combined nitrogen and flooding treatments were the smallest. For *S. nigra*, the greatest stomatal opening was observed in "control" individuals, followed by the three treatments involving flooding. The three treatments with nitrogen had the smallest stomatal length. Stomatal density of *S. amygdaloides* was not influenced by the treatments. The stomatal density of *S. nigra* varied according to the treatments, it was the highest in the "nitrogen overfertilization" treatment and the "cyclic" treatment.

Only some individuals of *S. miyabeana* and *S. nigra* developed adventitious roots in the "cyclic" treatments (Table 4). All species developed upward growing roots and for *S. amygdaloides* such roots were even observed in all treatments except the "flooding + N" treatment. The percentages of individuals possessing upward growing roots for each treatment were similar between *S. miyabeana* and *S. nigra*. The percentage of willows with lenticels is also reported in Table 4. *S. miyabeana* individuals with lenticels was observed in all treatments including in the "control" which contrasts with what it was observed in other species with this treatment. The treatments with flooding were the ones where individuals developed lenticels the most, even though they were found under the "nitrogen overfertilization" treatment too. The percentages of individuals possessing lenticels were exactly the same between *S. amygdaloides* and *S. nigra*. *Salix bebbiana* is the species where the least number of individuals with morphological characteristics were observed.

**Table 4. Mean values and standard deviation for leaf, stomata and plant morphological responses of the four willow species according to the different treatments.**

LEAF					
	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
Leaf area (cm <sup>2</sup> )					
<i>S. miyabeana</i>	7.11 ± 0.21 b	9.21 ± 1.47 a	6.23 ± 0.89 b	6.59 ± 0.30 b	6.49 ± 0.58 b
<i>S. amygdaloides</i>	10.80 ± 1.37 a	15.47 ± 1.42 a	10.01 ± 0.37 a	11.29 ± 7.08 a	13.33 ± 0.35 a
<i>S. nigra</i>	3.35 ± 0.32 c	5.78 ± 0.84 a	4.01 ± 0.23 bc	5.51 ± 0.89 ab	6.07 ± 1.63 a
<i>S. bebbiana</i>	6.33 ± 1.14 a	8.99 ± 1.38 a	2.60 ± 0.59 b	3.05 ± 2.69 b	0.95 ± 1.64 b
Water content (%)					
<i>S. miyabeana</i>	72.73 ± 2.33 bc	77.66 ± 0.35 a	75.53 ± 1.38 ab	70.50 ± 7.45 c	72.71 ± 3.78 bc
<i>S. amygdaloides</i>	68.98 ± 2.04 c	72.40 ± 1.68 a	70.43 ± 2.13 bc	70.83 ± 3.07 abc	70.93 ± 2.13 ab
<i>S. nigra</i>	68.80 ± 2.75 a	68.10 ± 1.47 a	69.91 ± 4.31 a	68.95 ± 4.11 a	70.57 ± 4.84 a
<i>S. bebbiana</i>	71.90 ± 3.01 a	73.33 ± 1.36 a	72.95 ± 8.85 a	53.25 ± 17.13 b	44.30 ± 24.18 b
STOMATA					
	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
Stomatal length (µm)					
<i>S. miyabeana</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>S. amygdaloides</i>	16.67 ± 2.71 b	16.42 ± 2.32 b	17.12 ± 2.59 a	15.51 ± 2.66 c	15.35 ± 2.95 d
<i>S. nigra</i>	13.78 ± 1.94 a	12.32 ± 2.14 d	13.37 ± 2.19 b	13.10 ± 2.10 b	12.92 ± 2.28 c
<i>S. bebbiana</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Stomatal density (stomata/mm <sup>2</sup> )					
<i>S. miyabeana</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>S. amygdaloides</i>	282 ± 54 a	294 ± 42 a	281 ± 37 a	325 ± 62 a	310 ± 57 a
<i>S. nigra</i>	347 ± 39 b	356 ± 69 ab	352 ± 63 b	329 ± 39 b	383 ± 52 a
<i>S. bebbiana</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORPHOLOGICAL FEATURES					
	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
Adventitious roots (% of plants with)					
<i>S. miyabeana</i>	0	0	0	0	17
<i>S. amygdaloides</i>	0	0	0	0	0
<i>S. nigra</i>	0	0	0	0	17
<i>S. bebbiana</i>	0	0	0	0	0
Upward growing roots (% of plants with)					
<i>S. miyabeana</i>	0	0	67	17	33
<i>S. amygdaloides</i>	17	17	100	0	17
<i>S. nigra</i>	0	0	83	0	67
<i>S. bebbiana</i>	0	17	0	0	0
Lenticels (% of plants with)					
<i>S. miyabeana</i>	83	67	100	100	100
<i>S. amygdaloides</i>	0	67	83	100	100
<i>S. nigra</i>	0	67	83	100	100
<i>S. bebbiana</i>	0	83	17	17	17

Note: Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$  within the same species. Only *S. amygdaloides* and *S. nigra* stomatal characteristics were investigated. Observations of morphological features are presented as qualitative; no statistical test was performed.

#### 2.4.4 Plant nutritional status and leachate treatment potential

Leaf macronutrient content are presented in Table 5. No significant differences between treatments and between species were observed for foliar potassium and magnesium contents. Change in phosphorus concentration was highly species-specific while calcium, sulfur and nitrogen varied strongly according to the treatment applied.

Very little difference between species and treatments in leaf phosphorus concentration was observed. For *S. amygdaloides* and *S. nigra*, no difference between treatments was observed. In the case of *S. miyabeana*, the foliar phosphorus concentrations of the treatments were all lower than the "control". Finally, for *S. bebbiana*, phosphorus concentration was negatively affected by flooding albeit the effect was less pronounced in the treatments where nitrogen and flooding were combined. When comparing species with each other, differences were observed only in the "nitrogen overfertilization" and the "flooding" treatments. In the "nitrogen overfertilization" treatment, leaf phosphorus was higher in *S. bebbiana* than in *S. amygdaloides* and *S. nigra*. In addition, leaves of *S. miyabeana* had superior phosphorus concentration than those of *S. nigra*. For the "flooding" treatment, the amount of leaf phosphorus in *S. miyabeana* and *S. amygdaloides* were comparable, *S. nigra* and *S. bebbiana* P concentration was much lower.

A higher concentration of calcium was found in leaves of *S. miyabeana* and those of *S. bebbiana* in treatments without flooding ("nitrogen overfertilization" and "control"), while for *S. amygdaloides* leaves with the highest calcium concentration were in the "control" treatment with the lowest under the flooding treatments. For *S. nigra*, the "control", "nitrogen overfertilization" and "cyclic" treatments had leaves with similar calcium concentration also, higher than those of the two other treatments ( $p > 0.05$ ). In all treatments, *S. miyabeana* was the species with the highest foliar calcium concentration, followed by *S. bebbiana* and finally *S. amygdaloides* and *S. nigra* equally.

For all three native willow species, more sulfur was detected in the leaves of individuals in the "flooding + N" treatment. The other two nitrogen treatments had the next highest leaf sulphur concentration. For *S. miyabeana*, the "nitrogen overfertilization" treatment corresponded to the greatest concentration of sulfur and was not significantly different from the "flooding + N"

treatment. When comparing the species, no significant differences between species for the two treatments combining nitrogen and flooding were detected. *S. miyabeana* showed the highest foliar sulfur concentration in "control" and "nitrogen overfertilization" treatments. For the "flooding" treatment, the leaves of *S. bebbiana* contained the least amount of sulfur while the leaves of the other three species did not have significantly different amounts.

Individuals in the "flooding + N" treatment had the highest foliar nitrogen concentration for the three native species. For *S. miyabeana*, it was a tie between the three treatments with N overfertilization ("nitrogen overfertilization", "flooding + N" and "cyclic"). For *S. miyabeana*, *S. nigra*, and *S. bebbiana*, the no-nitrogen treatments had lower leaf nitrogen concentration (around an average of 1.32% of difference) than the three nitrogen overfertilization treatments. However, for *S. amygdaloides*, the leaf nitrogen concentration of the "nitrogen overfertilization" treatment was similar ( $p>0.05$ ) to the one in the "flooding" treatment. There were few significant differences between species for each treatment.

#### **2.4.4. Willow filtration potential**

##### Nitrogen filtration potential

The extrapolation of such foliar nitrogen concentration allows estimate the potential of nitrogen taken up by the willows (Table 6). For all species, the highest level of nitrogen removal was observed under "nitrogen overfertilization" treatment i.e.  $>30\text{kg/ha}$  for *S. bebbiana*,  $>75\text{kg/ha}$  for *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* and *S. nigra*. With the exception of *S. nigra*, no such level was reached when flooding was combined to overfertilization. *Salix nigra* removal potential was comparable in all treatments that included nitrogen. For *S. amygdaloides* and *S. bebbiana*, no increase of nitrogen uptake under flooding with or without overfertilization was calculated. For *S. miyabeana*, the data calculated for the "cyclic" treatment was higher than the other two treatments including flooding as well as the "control".

**Table 5. Mean values and standard deviation for leaf macroelement concentrations of the four willow species according to the different treatments.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<b>K (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	1.90 ± 0.12	1.72 ± 0.16	2.22 ± 0.70	1.55 ± 0.41	1.24 ± 0.30
<i>S. amygdaloides</i>	1.41 ± 0.32	1.51 ± 0.33	1.93 ± 0.05	1.57 ± 0.10	1.11 ± 0.47
<i>S. nigra</i>	1.50 ± 0.06	1.46 ± 0.11	1.63 ± 0.22	1.45 ± 0.20	1.23 ± 0.31
<i>S. bebbiana</i>	1.34 ± 0.09	1.77 ± 0.29	1.76 ± 0.36	1.51 ± 0.08	1.11 ± 0.18
<b>Mg (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	0.35 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.32 ± 0.05
<i>S. amygdaloides</i>	0.42 ± 0.02	0.33 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.01
<i>S. nigra</i>	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.05	0.27 ± 0.06
<i>S. bebbiana</i>	0.44 ± 0.08	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.06	0.38 ± 0.04
<b>P (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	0.38 ± 0.06 aA	0.29 ± 0.02 bAB	0.26 ± 0.03 bA	0.22 ± 0.03 bA	0.27 ± 0.08 bA
<i>S. amygdaloides</i>	0.31 ± 0.10 aA	0.23 ± 0.07 aBC	0.27 ± 0.01 aA	0.29 ± 0.04 aA	0.28 ± 0.09 aA
<i>S. nigra</i>	0.23 ± 0.03 aA	0.20 ± 0.01 aC	0.19 ± 0.01 aB	0.21 ± 0.04 aA	0.22 ± 0.01 aA
<i>S. bebbiana</i>	0.30 ± 0.04 abA	0.36 ± 0.04 aA	0.19 ± 0.03 cB	0.26 ± 0.06 bcA	0.27 ± 0.03 bA
<b>Ca (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	1.85 ± 0.37 aA	2.00 ± 0.10 aA	1.01 ± 0.14 bA	0.57 ± 0.03 cA	1.13 ± 0.29 bA
<i>S. amygdaloides</i>	0.85 ± 0.08 aBC	0.67 ± 0.07 bC	0.49 ± 0.15 cdBC	0.43 ± 0.08 dB	0.62 ± 0.04 bcB
<i>S. nigra</i>	0.67 ± 0.02 aC	0.65 ± 0.06 aC	0.42 ± 0.04 bC	0.42 ± 0.15 bB	0.53 ± 0.11 abB
<i>S. bebbiana</i>	1.16 ± 0.12 bB	1.38 ± 0.14 aB	0.62 ± 0.07 cB	0.64 ± 0.08 cA	0.79 ± 0.11 cB
<b>S (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	0.38 ± 0.10 cA	0.64 ± 0.12 aA	0.23 ± 0.05 dA	0.56 ± 0.12 abA	0.45 ± 0.08 bcA
<i>S. amygdaloides</i>	0.20 ± 0.03 cB	0.29 ± 0.03 bcB	0.22 ± 0.01 cA	0.65 ± 0.08 aA	0.37 ± 0.08 bA
<i>S. nigra</i>	0.26 ± 0.03 cB	0.32 ± 0.04 bB	0.20 ± 0.03 cA	0.52 ± 0.03 aA	0.34 ± 0.04 bA
<i>S. bebbiana</i>	0.21 ± 0.02 dB	0.31 ± 0.01 cB	0.14 ± 0.03 dB	0.61 ± 0.02 aA	0.40 ± 0.10 bA
<b>N (%)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	1.77 ± 0.03 bA	3.37 ± 0.06 aB	2.14 ± 0.31 bAB	3.21 ± 0.85 aA	3.10 ± 0.57 aA
<i>S. amygdaloides</i>	1.79 ± 0.25 dA	3.03 ± 0.31 bcBC	2.53 ± 0.17 cA	4.01 ± 0.23 aA	3.36 ± 0.53 bA
<i>S. nigra</i>	1.90 ± 0.09 cA	2.78 ± 0.18 bC	2.14 ± 0.29 cAB	3.68 ± 0.28 aA	3.13 ± 0.26 bA
<i>S. bebbiana</i>	1.95 ± 0.11 cA	3.92 ± 0.15 aA	1.71 ± 0.10 cB	3.41 ± 0.52 aA	2.66 ± 0.25 bA

Note: Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$ . Different capital letters (column) indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters (row) indicate significant difference between treatments within the same species.

**Table 6. Mean values and standard deviation of total amount of foliar nitrogen removal (kg/ha) envisioned for the four willow species according to the different treatments.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<i>S. miyabeana</i>	6.72 ± 1.26 cA	82.56 ± 9.87aA	7.41 ± 1.85 cB	6.73 ± 0.56 cB	28.69 ± 12.56 bB
<i>S. amygdaloides</i>	5.90 ± 0.74 bA	75.11 ± 5.47 aA	10.17 ± 1.90 bAB	21.27 ± 23.79 bB	19.54 ± 11.90 bBC
<i>S. nigra</i>	5.29 ± 0.54 bA	78.24 ± 7.78 aA	11.27 ± 1.26 bA	61.42 ± 30.27 aA	60.44 ± 17.70 aA
<i>S. bebbiana</i>	3.45 ± 0.77 bB	31.30 ± 4.78 aB	1.22 ± 0.72 bC	1.91 ± 1.21 bB	1.96 ± 0.34 bC

Note: Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$ . Different capital letters (column) indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters (row) indicate significant difference between treatments within the same species.

### Leachate and substrate properties

The willow species used did not influence significantly the amount of nitrogen found in the leachate. Only the treatments had an influence on it (Table 7). The amount of nitrogen recovered in the leachate at the end of the experiment was significantly lower in the "flooding" treatment. The difference between the "flooding + N" and "cyclic" treatments was not significant.

Regarding substrate pH, willow species did not influence it either. Solo application of nitrogen or flooding decreased pH values significantly, and the combination of both treatments had a significant impact with  $>0.5$  pH for "cyclic" treatment.

**Table 7. Leachate and substrate properties at the end of the experiment.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<b>Leachate N content (mg/L)</b>	N/D	N/D	0.83 ± 0.11 b	1.54 ± 0.15 a	1.50 ± 0.14 a
<b>Substrate pH</b>	6.94 ± 0.05 a	6.54 ± 0.06 c	6.81 ± 0.04 b	6.62 ± 0.03 c	6.40 ± 0.05 d

Note: Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$ .

## 2.5. Discussion

The objectives of the present study were (1) to assess the impact of various treatments reproducing conditions of leachate application on the physiology, health and growth of four willow species in order to (2) better evaluate their phytotreatment potential and to (3) test different application procedures (cyclic vs permanent leachate irrigation).

### 2.5.1. Impact of leachate irrigation on willow cuttings

As expected of biomass crops, plants benefited from N surfertilization in all biomass compartments, but especially aboveground. Thus, root-to-shoot ratios were drastically reduced in treatments with nitrogen, a result consistent with the resource optimization hypothesis and the literature: Jerbi et al., 2015, 2020; Liu & Dickmann, 1992.

Furthermore, while species typically adapted to wetlands were not negatively impacted by flooding, the biomass production of *S. bebbiana*, that often naturally grow in more xeric habitats (Isebrands & Richardson, 2013), was severely inhibited and its growth has rapidly slowed down.

In our experiment, biomass partitioning of *S. miyabeana* was not impacted by soil flooding. Indeed, this willow has been used frequently in nitrogen-rich water treatment by plants with top success rate (Guidi Nissim et al., 2015; Jerbi et al., 2020; Lachapelle-T. et al., 2019; Sas et al., 2021). Selected for its fast growth and high productivity, *S. miyabeana* is known to exhibit anatomical features like lenticels (Cameron et al., 2010) that could be sufficiently effective to allow trees to perform well even if flooded (Kozlowski, 1997). Adventitious and upward growing roots are also adaptations that willows species such as *S. nigra* have developed (Jackson & Attwood, 1996; Jerbi et al., 2020; Kuzovkina et al., 2004; Li et al., 2006; Wang et al., 2017). All species tested in this study, but mostly the wetland adapted ones, showed at some point upward growing roots, lenticels or longer stomata under flood and higher leaf area, lenticels, smaller stomata aperture but slightly higher stomata density (*S. nigra* solely) under nitrogen overload. Others studies also corroborate those results with observations of hypertrophied lenticels and adventitious roots on *S. amygdaloides* and *S. nigra* when subjected to flooding (Kuzovkina et al., 2004; Pereira & Kozlowski, 1977) and upward growing roots on *S. nigra* (Kuzovkina et al., 2004). Morphological adaptations were hardly ever observed on *S. bebbiana*. On the other side, *S. nigra* exhibited a



worthwhile plasticity regarding the above mentioned but also the most conservative isohydric behavior with no change of leaf water content (Sade et al., 2012). As such, it may not yield the most under usual field conditions, but it does when resources are maximized or even in excess (water or nitrogen). In both conditions, changes of its nutritional status remained also fairly buffered compared to other species albeit of course a global increase in foliar N content when fertilized.

A general response patterns to the combined nitrogen + flooding treatments emerged for species more adapted to riparian environment that clearly benefit from leachate treatment. While *S. bebbiana* suffered from the experimental procedures, *S. miyabeana*, *S. amygdaloides* and *S. nigra* performed equally or even better than in "control" conditions. Only a few parameters like a decrease in foliar calcium content may be indicative of the stress induced by permanent "flooding + N" though reduced when the stress was intermittent. However, this can be explained by the fact that flooding and nitrogen overfertilization can have negative effects on roots and thus on their nutrient uptake (Barak et al., 1997; Kozłowski, 1997). Generally, for those species, we observed a good above-ground biomass production, in the combined flooding and nitrogen treatments, with a clear downward shift of the root-to-shoot ratio and a higher leaf surface area to maximise transpiration, thus resulting in an increased foliar concentration of the applied nitrogen. Similar results were observed in Weih & Nordh (2002) when they tested different irrigation and fertilization regimes on 14 willow species. It has also been previously observed that the nitrogen concentration and leaf area of *S. miyabeana* are increased by wastewater irrigation (Jerbi et al., 2020). We also noted that the root biomass of *S. amygdaloides*, *S. nigra* and *S. miyabeana* was essentially unchanged by the combined nitrogen and flooding treatments. Roots could still contribute to the stimulation of soil ecosystem and to the sorption and degradation of metals and organic compounds which is essential to biofiltrate the leachate (Jones et al., 2006). More species-specific responses in terms of morphological features deserves to be considered more carefully to evaluate the respective performance of the tested willows.

### **2.5.2. Phytotreatment with indigenous willow species**

As it is already used in phytotreatment projects, *S. miyabeana* was expected to be the best performing species under flooding and nitrogen overfertilization conditions (Courchesne et al., 2017; Guidi Nissim et al., 2014; Mirck & Volk, 2010) but a similar or higher level of productivity was observed for well-adapted indigenous species.

In this study, *S. amygdaloides* and *S. nigra* had high leaf nitrogen concentration, a good indicator of the plant's ability to take up nitrogen from the substrate (Simon et al., 1990). Furthermore, while foliar nitrogen concentrations were rather similar between wetland species when treated with combined nitrogen and flooding, it is interesting to note that it was also significantly increased for *S. amygdaloides* growing under the "flooding" treatment. Although the difference was not significant in (Rodríguez et al., 2018), they also observed an increase in leaf nitrogen of *S. amygdaloides* subjected to flooding. Together with high leaf water content, such nitrogen concentration could reflect its ability to maintain photosynthesis processes during flood. Foliar nitrogen could be used to counteract the adverse effects trees experienced (Rodríguez et al., 2018) and thus specifically explaining why they may have benefit even more clearly than *S. miyabeana* from an alternating fertigation regime (Jackson & Attwood, 1996; Wang et al., 2017). Hence, the differences here highlighted make a clear distinction between willows. *S. amygdaloides* and *S. nigra* show a wide range of adaptative traits that allow the conception of more versatile leachate phytofiltration components for engineered ecological landscaping.

### **2.5.3. Leachate application strategy and environmental applicability**

The soil and leachate monitoring highlight the need of a large-scale testing trial of those indigenous willow species and of an intermittent "cyclic" fertigation regime. In this experiment we have tested two leachate application procedures and the "cyclic" treatment was as promising as conventional permanent fertigation regime, first because of nitrogen filtration potential. Of course, significant nitrogen concentration was leaching at the end of the experiment (eq. > 200kg.ha<sup>-1</sup> more in "flooding +N" than in "flooding" conditions) but plants were still at a juvenile phase with no mature root system to fully colonize the substrate and capture the available stock of nutrients (Goodlass et al., 2007; Labrecque & Teodorescu, 2005). Furthermore, the N

concentration reported in leaves was indicative of an optimal nutrient supply (Kopinga & van den Burg, 1995) and consistent with the literature values (Aronsson & Perttu, 2001; Hofmann-Schielle et al., 1999), so are the projected nitrogen removal rate (Fabio & Smart, 2018) which could thus rank close to the  $>400\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  estimates given by Caslin et al. (2010) when aboveground biomass is more realistically harvested at 2-3 years of age after being adequately fertilized.

## 2.6. Conclusion

In summary, we report that cultivar *Salix miyabeana* 'SX64' and indigenous willows *S. nigra* and *S. amygdaloides* showed abilities to adapt to nitrogen overfertilization and flooding in addition to removing nitrogen from leachate and could thus all be tested in pilot-scale experiment for further long-term confirmation. The biomass and growth of the willows was not reduced by the treatments. Biomass of *S. nigra* was even increased in the combined flooding and nitrogen treatments. The species also demonstrated several adaptive features to flooding such as adventitious and upward growing roots, and lenticels. Regarding its phytoremediation capacities, *S. nigra* stood out for the amount of nitrogen stored in its leaf biomass, which was significantly higher than that of the other species in the experiment. When comparing leachate application techniques, intermittent application had beneficial effects on willow growth compared to more conventional fertigation. More morphological adaptations were also observed in this treatment. The total amount of nitrogen contained in the willow leaves and the amount of nitrogen remaining in the leachate at the end of the experiment did not differ between application methods, hence enlarging our perspective for engineered ecological landscaping.



## Chapitre 3 – Conclusion générale et perspectives

### 3.1. Retour sur les objectifs et les hypothèses

Cette expérience avait pour but d'aider à la compréhension générale des effets engendrés par la fertigation à partir de lixiviat provenant de LET sur la physiologie, la santé et la croissance de saules. L'étude a permis d'évaluer et de comparer le potentiel de saules (dont trois espèces indigènes au Québec) et de méthodes d'application du lixiviat pour le phytotraitement de lixiviat.

#### 3.1.1. Retour sur l'objectif et l'hypothèse 1

Suivant l'objectif 1, nous souhaitions observer les réponses des saules à l'inondation de leur substrat et à la surfertilisation à l'azote. Pour ce faire, nous avons mis en place une expérience en milieu semi-contrôlé, pris des mesures de croissance, de biomasse (feuilles, tiges et racines), d'aire foliaire, de contenu en eau et en nutriments foliaires ainsi que de longueur et de densité stomatique. La présence de caractéristiques morphologiques telles les lenticelles, les racines adventives et verticales a aussi été notée pour répondre à l'objectif.

Comme attendu, nous avons observé beaucoup de réponses différentes entre les espèces. Toutefois, celles-ci étaient plus variées et complexes que ce à quoi nous nous attendions. À l'origine, nous pensions que les espèces des milieux humides auraient des réponses similaires entre elles et que les espèces ayant des capacités connues pour tolérer des contaminants se ressembleraient. Pourtant ce n'est pas ce que nous avons observé. En effet, les réponses varient énormément d'une espèce à l'autre malgré certaines caractéristiques communes. De façon générale, *S. amygdaloides*, *S. nigra* et *S. miyabeana*, soit les trois espèces qui naturellement colonisent les habitats humides, ont bien toléré les traitements (azote et inondation confondus). En fait, à l'exception de la croissance de *S. miyabeana* pour le traitement "inondation + azote", la croissance et la biomasse de ces espèces n'ont pas diminué suivant les traitements en comparaison aux témoins. Quant à *S. bebbiana*, celui-ci fut grandement impacté négativement par les traitements d'inondation. Ce résultat était attendu puisque l'espèce se trouve souvent dans les environnements xériques (Isebrands & Richardson, 2013). Pour les trois espèces

indigènes, le ratio de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne fut impacté par tous les traitements par rapport aux témoins. Les traitements combinant l'inondation et l'azote ont eu l'effet le plus important sur ce ratio et ce pour toutes les espèces.

Si l'on peut généraliser pour les données récoltées concernant la croissance et la biomasse selon les affinités hydriques des saules, ce n'est pas le cas des autres mesures. Toutefois, pour *S. bebbiana*, les résultats sont très simples à résumer: les traitements d'inondation ont impacté négativement toutes les caractéristiques observées et l'espèce n'a que très peu démontré de réponses morphologiques aux traitements. En ce qui concerne *S. miyabeana*, ses caractéristiques foliaires (aire foliaire et contenu en eau) ont augmenté dans le traitement d'azote seul. Aucune autre différence n'a été observée entre les traitements pour l'aire foliaire de cette espèce. Toutefois, son contenu en eau a diminué suivant le traitement où l'azote et l'inondation sont appliqués de façon permanente. L'espèce semble donc très résistante et adaptée aux contraintes imposées par l'inondation et la surfertilisation à l'azote puisque ses caractéristiques foliaires sont très peu modifiées. Quant à *S. amygdaloides*, tous les traitements d'azote ont eu un effet positif sur le contenu en eau de ses feuilles. Par contre, ni l'inondation, ni l'azote n'a affecté son aire foliaire. Pour *S. nigra* ce fut l'inverse, le contenu en eau des feuilles est resté in affecté par les traitements alors que l'aire foliaire était supérieure pour les traitements avec de l'azote. Ainsi, il semblerait que ces deux espèces, *S. amygdaloides* et *S. nigra*, démontrent une certaine plasticité en regard à la surfertilisation à l'azote quant à leurs caractéristiques foliaires. Ce sont d'ailleurs les valeurs stomatiques de ces deux espèces qui ont pu être comparées. La densité stomatique et la longueur des stomates de *S. nigra* se sont révélées d'une plus grande plasticité.

Comme les résultats obtenus sont complexes, il est difficile de faire une généralisation pour tous les saules selon leur affinité aux milieux humides. Ainsi, on ne peut se servir de cette caractéristique afin de déterminer si l'utilisation d'une plante pour la phytoremédiation de lixiviat sera efficace. Il faut plutôt se concentrer sur les caractéristiques propres de chaque saule pour bien comprendre et évaluer leur performance puisqu'ils réagissent tous différemment aux traitements. Des études devront donc être réalisées afin d'être en mesure de lier les caractéristiques connues et mesurables des plantes et leur potentiel d'application comme phytotechnologie dans le but de réaliser des présélections d'espèces plus efficaces.

### 3.1.2. Retour sur l'objectif et l'hypothèse 2

Le deuxième objectif de l'expérience avait pour but de comparer le potentiel des espèces de saule de l'étude à capter l'azote présente dans le lixiviat. Pour cet objectif, les données de concentration foliaire en azote ont été utilisées comme se sont de bons indicateurs de la capacité de la plante à capter l'azote du substrat (Simon et al., 1990). Comme *S. miyabeana* est déjà utilisé dans des projets de phytotraitement de lixiviat, nous nous attendions à ce que ce soit l'espèce la plus performante, particulièrement dans les deux traitements combinant l'azote et l'inondation. Toutefois, aucune différence de concentration d'azote foliaire n'a été observée entre les espèces pour ces traitements. Ainsi toutes les espèces de l'étude ont le potentiel de capter l'azote du lixiviat provenant de LET. Toutefois, il est également important de prêter attention aux adaptations des saules aux deux contraintes qu'imposent le lixiviat. En effet, comme discuté dans la section précédente, lors du retour sur l'hypothèse 1, *S. bebbiana* n'est pas du tout adapté aux conditions d'inondation, même lorsque de l'azote est ajouté. Tout porte donc à croire que l'utilisation de cette espèce pour le traitement de lixiviat serait un mauvais choix. À l'opposé, les trois autres espèces, *S. amygdaloides*, *S. nigra* et *S. miyabeana*, ont montré une bonne capacité à résister à la surfertilisation à l'azote et à l'inondation et pourraient donc être efficaces pour retirer l'azote du lixiviat.

En extrapolant les données d'azote foliaire et de biomasse foliaire et en supposant une densité de 16 000 arbres par hectare et une saison de croissance d'environ 18 semaines, nous avons pu évaluer les quantités d'azote qui pourraient être extraites par les saules testés s'ils étaient utilisés dans un vrai projet de phytotraitement de lixiviat. Dans cette situation fictive, *S. nigra* s'est révélé l'espèce la plus prometteuse: sa grande biomasse foliaire et sa capacité d'absorption de l'azote la font se démarquer des autres. *S. amygdaloides* est le deuxième champion dans le traitement combinant l'azote et l'inondation de façon permanente alors que c'est *S. miyabeana* qui a cette place dans le traitement cyclique. Toutefois, il est important de noter que l'architecture de *S. nigra* pourrait rendre son utilisation dans des champs de traitement de lixiviat plutôt compliqué. En effet, cette espèce avait tendance dans notre expérience, particulièrement dans les traitements azotés, à croître à l'horizontal plutôt qu'à la verticale. Cette caractéristique reflète certainement une forme d'adaptation des tissus, cellules ou molécules structurant la tige, mais

pourrait avoir des conséquences négatives pour des questions d'espace et de gestion des plantes (entretien, récolte, etc.), ce qui n'est pas le cas avec *S. miyabeana*.

### **3.1.3. Retour sur l'objectif et l'hypothèse 3**

Pour l'objectif 3, nous avons voulu comparer les techniques d'application de lixiviat (permanente versus cyclique). Nous nous attendions à ce que le traitement cyclique démontre de nets avantages et il semble effectivement que cette période de repos soit une bonne chose pour les saules. Aucune différence quant aux quantités d'azote retrouvées dans le lixiviat à la fin de l'expérience, de la biomasse et des ratios de répartition de la biomasse des saules n'a été observée entre les deux méthodes d'application. De plus, en ce qui concerne les quantités d'azote totale extraites par les saules, la seule différence fut pour *S. miyabeana*. Cette espèce a capté davantage d'azote dans le traitement cyclique que dans le traitement permanent. Toutefois, la croissance a été significativement plus importante dans le traitement cyclique pour les trois espèces caractéristiques des milieux moins bien drainés. De plus, les racines adventives et les racines verticales étaient plus présentes chez les saules exposés de façon cyclique au lixiviat de l'expérience.

Nous croyons que la courte durée de l'expérience a peut-être empêché de voir des différences plus marquées entre les méthodes d'application du lixiviat sur la biomasse des saules et leur taux de filtration de l'azote du lixiviat. Toutefois, comme la croissance et les adaptations morphologiques ont bénéficié de l'application cyclique, nous pensons qu'ultimement cette méthode serait bénéfique pour la phytoremédiation du lixiviat et les saules puisqu'ils seraient davantage en mesure de s'adapter aux contraintes.



### 3.2. Perspectives

En ce qui concerne les diverses réponses présentées par les saules pour résister à l'inondation et la surfertilisation à l'azote, nous croyons que les résultats obtenus permettent une bonne introduction au sujet. Des études moléculaires pourraient être pertinentes pour observer des réponses plus fines et améliorer notre compréhension des impacts de tels traitements. De plus, comme mentionné précédemment, les résultats observés étaient très variables entre les saules testés et ne peuvent être extrapolés à d'autres espèces, voire à d'autres cultivars. Cela nous rappelle donc l'importance de bien étudier chacun et leurs capacités à tolérer des contraintes et à répondre aux besoins du projet avant de l'utiliser à grande échelle. Aussi, si l'on veut pouvoir utiliser des caractéristiques observables et mesurables sur les plantes afin de déterminer leur potentiel d'utilisation comme phytotechnologie, il faudra effectuer davantage d'études afin de mieux cerner ces caractéristiques.

Dans notre expérience, la surfertilisation à l'azote n'a finalement pas impacté négativement la croissance et la biomasse des saules. Il est donc à croire que les saules de l'étude sont en mesure de tolérer d'encore plus grandes quantités d'azote. Il serait donc pertinent de faire d'autres études avec des charges variées en azote afin de déterminer le seuil limite que peuvent tolérer chacun des saules avant que sa biomasse soit impactée négativement.

Tout le long de ce mémoire, nous avons principalement parlé de projets de phytoremédiation de lixiviat à grande échelle où les saules sont utilisés en monoculture afin de traiter le lixiviat et de produire de la biomasse. Cependant, il faut savoir qu'il existe d'autres possibilités d'utilisation des résultats produit lors de l'expérience. Par exemple, l'on pourrait utiliser des saules indigènes, tel *S. amygdaloides* et *S. nigra*, dans un arrangement avec des herbacées entre les rangs ou les bosquets dans le but de traiter soit de petites quantités de lixiviat ou d'eaux usées. Utilisée en milieu urbain cette phytotechnologie pourra, en plus d'être esthétiquement plaisante, aider à contrer les îlots de chaleur. Il serait également possible de planter ces deux mêmes saules en bordure de champ encore une fois avec des herbacées, afin de limiter le sol à nu et favoriser la biodiversité. Cet arrangement pourrait ainsi capter les possible ruissellements de fertilisant (souvent azotés) tout en servant de haie brise-vent ou de stabilisateur de pente. L'étude de

différentes combinaisons d'espèces, autant des saules que d'autres taxons, pourrait être bénéfique afin de mettre en place un projet avec un objectif de biodiversité et de maximisation des services écosystémiques.

Les phytotechnologies gagnent en popularité partout dans le monde. Elles permettent de mettre en place des solutions alternatives à des problèmes environnementaux qui sont de plus en plus fréquents avec l'industrialisation de notre société. Les saules sont des plantes prometteuses qui ont leur rôle à jouer dans la lutte contre les changements climatiques. Des recherches doivent être faites afin de mieux les connaître et de pouvoir les utiliser de façon efficace.

## Références bibliographiques

- Adegbidi, H. G., Volk, T. A., White, E. H., Abrahamson, L. P., Briggs, R. D., & Bickelhaupt, D. H. (2001). Biomass and nutrient removal by willow clones in experimental bioenergy plantations in New York State. *Biomass and Bioenergy*, *20*, 399-411.
- Aronsson, P. G., & Bergström, L. F. (2001). Nitrate leaching from lysimeter-grown short-rotation willow coppice in relation to N-application, irrigation and soil type. *Biomass and Bioenergy*, *21*(3), 155-164. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00022-8)
- Aronsson, P., & Perttu, K. (2001). Willow vegetation filters for wastewater treatment and soil remediation combined with biomass production. *The Forestry Chronicle*, *77*(2), 293-299.
- Bailey-Serres, J., & Voeselek, L. A. C. J. (2008). Flooding Stress : Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 313-339. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752>
- Barak, P., Jobe, B. O., Krueger, A. R., Peterson, L. A., & Laird, D. A. (1997). Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin. *Plant Ad Soil*, *197*, 61-69.
- Bialowiec, A., Wojnowska-Baryla, I., & Hasso-Agopsowicz, M. (2003). *Effectiveness of leachate disposal by the young willow sprouts Salix amygdalina*. Waste Manage. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14986717>
- Bolan, N. S., Hedley, M. J., & White, R. E. (1991). *Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures*. 11.
- Börjesson, P., & Berndes, G. (2006). The prospects for willow plantations for wastewater treatment in Sweden. *Biomass and Bioenergy*, *30*(5), 428-438. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.11.018>

- Boru, G. (2003). Responses of Soybean to Oxygen Deficiency and Elevated Root-zone Carbon Dioxide Concentration. *Annals of Botany*, 91(4), 447-453.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg040>
- Burton, S. A. Q., & Watson-Craik, I. A. (1998). Ammonia and nitrogen fluxes in landfill sites : Applicability to sustainable landfilling. *Waste Management & Research*, 16(1), 41-53.  
<https://doi.org/10.1177/0734242X9801600106>
- Cameron, K., Smart, L., Ballard, B., Volk, T., & Abrahamson, L. (2010). *Salix miyabeana* « SX64 ». *Willowpedia Fact Sheet, Cornell University (Ed.)*.
- Caslin, B., Finnan, J., McCracken, A., & Walsh, L. (2010). Short Rotation Coppice Willow—Best Practice Guidelines. *Teagasc, Crop Research Center*.
- Cerrillo, T., Rodríguez, M. E., Achinelli, F., Doffo, G., & Luquez, V. M. (2013). Do greenhouse experiments predict willow responses to long term flooding events in the field? *Bosque (Valdivia)*, 34(1), 17-18. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002013000100009>
- Colmer, T. D., & Voesenek, L. A. C. J. (2009). Flooding tolerance : Suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36(8), 665. <https://doi.org/10.1071/FP09144>
- Conger, R. M. (2003). Black willow (*Salix nigra*) use in phytoremediation techniques to remove the herbicide bentazon from shallow groundwater. *LSU Doctoral Dissertations*, 3686, 131.
- Corseuil, H. X., & Moreno, F. N. (2001). Phytoremediation potential of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended gasoline. *Water Research*, 35(12), 3013-3017.  
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00588-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00588-1)
- Courchesne, F., Turmel, M.-C., Cloutier-Hurteau, B., Constantineau, S., Munro, L., & Labrecque, M. (2017). Phytoextraction of soil trace elements by willow during a phytoremediation

- trial in Southern Québec, Canada. *International Journal of Phytoremediation*, 19(6), 545-554. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1267700>
- Cureton, P. M., Groenevelt, P. H., & McBride, R. A. (1991). Landfill Leachate Recirculation : Effects on Vegetation Vigor and Clay Surface Cover Infiltration. *Journal of Environmental Quality*, 20(1), 17-24. <https://doi.org/10.2134/jeq1991.00472425002000010005x>
- Danielescu, S., Van Stempvoort, D. R., Bickerton, G., & Roy, J. W. (2020). Use of mature willows (*Salix nigra*) for hydraulic control of landfill-impacted groundwater in a temperate climate. *Journal of Environmental Management*, 272, 111106. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111106>
- Dimitriou, I., Aronsson, P., & Weih, M. (2006). Stress tolerance of five willow clones after irrigation with different amounts of landfill leachate. *Bioresource Technology*, 97(1), 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.004>
- Doffo, G. N., Monteoliva, S. E., Rodríguez, M. E., & Luquez, V. M. C. (2017). Physiological responses to alternative flooding and drought stress episodes in two willow (*Salix* spp.) clones. *Canadian Journal of Forest Research*, 47(2), 174-182. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0202>
- Fabio, E. S., & Smart, L. B. (2018). Effects of nitrogen fertilization in shrub willow short rotation coppice production—A quantitative review. *GCB Bioenergy*, 10(8), 548-564. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12507>
- Fontana, M. (2016). *Étude des facteurs pédoclimatiques et nutritifs régissant la croissance de Salix miyabeana SX67*. 160.

- Fontana, M., Labrecque, M., Collin, A., & Bélanger, N. (2017). Stomatal distribution patterns change according to leaf development and leaf water status in *Salix miyabeana*. *Plant Growth Regulation*, *81*(1), 63-70. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0185-8>
- Fontana, M., Labrecque, M., Messier, C., Courchesne, F., & Bélanger, N. (2017). Quantifying the effects of soil and climate on aboveground biomass production of *Salix miyabeana* SX67 in Quebec. *New Forests*, *48*(6), 817-835. <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9599-z>
- Frédette, C., Comeau, Y., & Brisson, J. (2019). Ecophysiological responses of a willow cultivar (*Salix miyabeana* 'SX67') irrigated with treated wood leachate. *Water, Air, & Soil Pollution*, *230*(8), 205.
- Frédette, C., Grebenshchikova, Z., Comeau, Y., & Brisson, J. (2019). Evapotranspiration of a willow cultivar (*Salix miyabeana* SX67) grown in a full-scale treatment wetland. *Ecological Engineering*, *127*, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.11.027>
- Frédette, C., Labrecque, M., Comeau, Y., & Brisson, J. (2019). Willows for environmental projects : A literature review of results on evapotranspiration rate and its driving factors across the genus *Salix*. *Journal of Environmental Management*, *246*, 526-537. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.010>
- Gardner, W. R., & Ehlig, C. F. (1963). The influence of soil water on transpiration by plants. *Journal of Geophysical Research*, *68*(20), 5719-5724. <https://doi.org/10.1029/JZ068i020p05719>
- González-Méndez, B., Webster, R., Fiedler, S., & Siebe, C. (2017). Changes in soil redox potential in response to flood irrigation with waste water in central Mexico : Redox response to flood irrigation with waste water. *European Journal of Soil Science*, *68*(6), 886-896. <https://doi.org/10.1111/ejss.12484>

- Goodlass, G., Green, M., Hilton, B., & McDonough, S. (2007). Nitrate leaching from short-rotation coppice. *Soil Use and Management*, 23(2), 178-184. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2006.00080.x>
- Greenway, H., Armstrong, W., & Colmer, T. D. (2006). Conditions Leading to High CO<sub>2</sub> (>5 kPa) in Waterlogged–Flooded Soils and Possible Effects on Root Growth and Metabolism. *Annals of Botany*, 98(1), 9-32. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl076>
- Grenier, V., Pitre, F., Guidi Nissim, W., & Labrecque, M. (2015). Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil. *Trees*, 29(3), 871-881.
- Guidi Nissim, W., Jerbi, A., Lafleur, B., Fluet, R., & Labrecque, M. (2015). Willows for the treatment of municipal wastewater : Performance under different irrigation rates. *Ecological Engineering*, 81, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.067>
- Guidi Nissim, W., & Labrecque, M. (2010). Effects of High Water Supply on Growth, Water Use, and Nutrient Allocation in Willow and Poplar Grown in a 1-Year Pot Trial. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207(1-4), 85-101. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0121-x>
- Guidi Nissim, W., Pitre, F. E., Teodorescu, T. I., & Labrecque, M. (2013). Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. *Biomass and Bioenergy*, 56, 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.020>
- Guidi Nissim, W., Voicu, A., & Labrecque, M. (2014). Willow short-rotation coppice for treatment of polluted groundwater. *Ecological Engineering*, 62, 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.10.005>

- Heine, P. (2018). Réponse physiologique d'espèces ligneuses à un sol contaminé en PCP et ACC dans un contexte de phytoremédiation. *Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en sciences biologiques*, 74.
- Hofmann-Schielle, C., Jug, A., Makeschin, F., & Rehfuss, K. E. (1999). Short-rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable land in the Federal Republic of Germany. I. Site-growth relationships. *Forest Ecology and Management*, 121(1-2), 41-55. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(98\)00555-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(98)00555-6)
- Isebrands, J. G., & Richardson, J. (Éds.). (2013). *Poplars and willows : Trees for society and the environment*. CABI ; FAO.
- Jackson, M. B., & Attwood, P. A. (1996). Roots of willow (*Salix viminalis* L.) show marked tolerance to oxygen shortage in flooded soils and in solution culture. *Plant and Soil*, 187, 37-45.
- Jerbi, A., Brereton, N. J. B., Sas, E., Amiot, S., Lachapelle-T., X., Comeau, Y., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2020). High biomass yield increases in a primary effluent wastewater phytofiltration are associated to altered leaf morphology and stomatal size in *Salix miyabeana*. *Science of The Total Environment*, 738, 139728. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139728>
- Jerbi, A., Nissim, W. G., Fluet, R., & Labrecque, M. (2015). Willow Root Development and Morphology Changes Under Different Irrigation and Fertilization Regimes in a Vegetation Filter. *BioEnergy Research*, 8(2), 775-787. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9550-5>
- Jones, D. L., Williamson, K. L., & Owen, A. G. (2006). Phytoremediation of landfill leachate. *Waste Management*, 26(8), 825-837. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.014>



- Justin, M. Z., Jurše, A., & Vrhovšek, D. (2011). *Willow Plantation on Rehabilitated Municipal Landfill Site in Function of Landfill Leachate Phytoremediation and Evapotranspiration*. 14.
- Kang, D.-H., Tsao, D., Wang-Cahill, F., Rock, S., Schwab, A. P., & Banks, M. K. (2008). Assessment of Landfill Leachate Volume and Concentrations of Cyanide and Fluoride during Phytoremediation. *Bioremediation Journal*, 12(1), 32-45.  
<https://doi.org/10.1080/10889860701866297>
- Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Sarneel, J. M., & Hefting, M. M. (2013). Tea Bag Index : A novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(11), 1070-1075. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12097>
- Kjeldsen, P., Barlaz, M. A., Rooker, A. P., Baun, A., Ledin, A., & Christensen, T. H. (2002). Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate : A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32(4), 297-336.  
<https://doi.org/10.1080/10643380290813462>
- Kopinga, J., & van den Burg, J. (1995). *Using soil and foliar analysis to diagnose the nutritional status of urban trees*. 8.
- Kozlowski, T. T. (1984). Plant Responses to Flooding of Soil. *BioScience*, 34(3), 162-167.  
<https://doi.org/10.2307/1309751>
- Kozlowski, T. T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, 17(7), 490-490. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.7.490>
- Kuzovkina, Y. A., Knee, M., & Quigley, M. F. (2004). Effects of Soil Compaction and Flooding on the Growth of 12 Willow (*Salix L.*) Species. . . *September*, 7.

- Kuzovkina, Y. A., & Volk, T. A. (2009). The characterization of willow (*Salix L.*) varieties for use in ecological engineering applications : Co-ordination of structure, function and autecology. *Ecological Engineering*, 35(8), 1178-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.03.010>
- Kuzovkina, Y. A., Weih, M., Romero, M. A., Charles, J., Hust, S., Mclvor, I., Karp, A., Trybush, S., Labrecque, M., Teodorescu, T. I., Singh, N. B., Smart, L. B., & Volk, T. A. (2008). *Salix* : Botany and Global Horticulture. Dans J. Janick (Éd.), *Horticultural Reviews* (p. 447-489). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470380147.ch8>
- Labrecque, M., & Lajeunesse, S. L. (2017). Guide de production de saules en culture intensive sur courtes rotations. *Publication du Réseau des Plantes Bio-industrielles du Québec*, 29.
- Labrecque, M., & Teodorescu, T. I. (2005). Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). *Biomass and Bioenergy*, 29(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.12.004>
- Lachapelle-T., X., Labrecque, M., & Comeau, Y. (2019). Treatment and valorization of a primary municipal wastewater by a short rotation willow coppice vegetation filter. *Ecological Engineering*, 130, 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.02.003>
- Lévesque, S., Demers, E., Brisson, J., & Comeau, Y. (2017). Treatment of a mixed wood preservative leachate by a hybrid constructed wetland and a willow planted filter. *Water Science and Technology*, 76(1), 164-171. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.197>
- Li, S., Pezeshki, S. R., Goodwin, S., & Shields, F. D. (2004). *Physiological responses of black willow (Salix nigra) cuttings to a range of soil moisture regimes*. 6.

- Li, S., Reza Pezeshki, S., & Douglas Shields, F. (2006). Partial flooding enhances aeration in adventitious roots of black willow (*Salix nigra*) cuttings. *Journal of Plant Physiology*, *163*(6), 619-628. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.06.010>
- Liu, Z., & Dickmann, D. I. (1992). Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. I. Morphology and growth. *Canadian Journal of Botany*, *70*(11), 2265-2270. <https://doi.org/10.1139/b92-281>
- Liu, Z., & Dickmann, D. I. (1993). Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. II. Gas exchange and water relations. *Canadian Journal of Botany*, *71*(7), 927-938. <https://doi.org/10.1139/b93-104>
- Lodge, D. J. (1989). The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo- and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. *Plant and Soil*, *117*(2), 243-253. <https://doi.org/10.1007/BF02220718>
- Lower, S. S., & Orians, C. M. (2003). Soil nutrients and water availability interact to influence willow growth and chemistry but not leaf beetle performance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *107*(1), 69-79. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00037.x>
- Luo, F.-L., Nagel, K. A., Zeng, B., Schurr, U., & Matsubara, S. (2009). Photosynthetic acclimation is important for post-submergence recovery of photosynthesis and growth in two riparian species. *Annals of Botany*, *104*(7), 1435-1444. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp257>
- MELCC. (2020). Règlement sur l'enfouissement et l'incinération de matières résiduelles. *Éditeur officiel du Québec*, 78.

- Mirck, J., & Volk, T. A. (2010). Response of three shrub willow varieties (*Salix* spp.) to storm water treatments with different concentrations of salts. *Bioresource Technology*, *101*(10), 3484-3492. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.128>
- Neff, J. C., Townsend, A. R., Gleixner, G., Lehman, S. J., Turnbull, J., & Bowman, W. D. (2002). Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature*, *419*(6910), 915-917. <https://doi.org/10.1038/nature01136>
- Nixon, D. J., Stephens, W., Tyrrel, S. F., & Brierley, E. D. R. (2001). The potential for short rotation energy forestry on restored land<sup>®</sup>ll caps. *Bioresource Technology*, *9*.
- Pereira, J. S., & Kozlowski, T. T. (1977). Variations among Woody Angiosperms in Response to Flooding. *Physiologia Plantarum*, *41*(3), 184-192. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb05555.x>
- Pezeshki, S. R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, *46*(3), 299-312. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00107-1)
- Pezeshki, S. R., Li, S., Shields, F. D., & Martin, L. T. (2007). Factors governing survival of black willow (*Salix nigra*) cuttings in a streambank restoration project. *Ecological Engineering*, *29*(1), 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.07.014>
- Pezeshki, S. R., Pardue, J. H., & DeLaune, R. D. (1996). Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiology*, *16*(4), 453-458. <https://doi.org/10.1093/treephys/16.4.453>
- Pilon-Smits, E. (2005). PHYTOREMEDIATION. *Plant Biology*, *56*(1), 15-39.

- Prescott, C. E. (2010). Litter decomposition : What controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils? *Biogeochemistry*, 101(1-3), 133-149.  
<https://doi.org/10.1007/s10533-010-9439-0>
- Qasim, S. R., & Chiang, W. (1994). *Sanitary Landfill Leachate : Generation, Control and Treatment*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9780203740217>
- Recyc-Québec. (2018). *Bilan 2018 de la gestion des matières résiduelles au Québec*. 52.
- Renou, S., Givaudan, J. G., Poulain, S., Dirassouyan, F., & Moulin, P. (2008). Landfill leachate treatment : Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3), 468-493.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.077>
- Rodríguez, M. E., Doffo, G. N., Cerrillo, T., & Luquez, V. M. C. (2018). Acclimation of cuttings from different willow genotypes to flooding depth level. *New Forests*, 49(3), 415-427.  
<https://doi.org/10.1007/s11056-018-9627-7>
- Rood, S. B., Nielsen, J. L., Shenton, L., Gill, K. M., & Letts, M. G. (2010). Effects of flooding on leaf development, transpiration, and photosynthesis in narrowleaf cottonwood, a willow-like poplar. *Photosynthesis Research*, 104(1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9511-6>
- Rosenqvist, H., & Ness, B. (2004). An economic analysis of leachate purification through willow-coppice vegetation filters. *Bioresource Technology*, 94(3), 321-329.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.017>
- Sade, N., Gebremedhin, A., & Moshelion, M. (2012). Risk-taking plants : Anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), 767-770.  
<https://doi.org/10.4161/psb.20505>

- Sainju, U., Ghimire, R., & P. Pradhan, G. (2020). Nitrogen Fertilization I : Impact on Crop, Soil, and Environment. Dans E. Cid Rigobelo & A. Pereira Serra (Éds.), *Nitrogen Fixation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86028>
- Sas, E., Hennequin, L. M., Frémont, A., Jerbi, A., Legault, N., Lamontagne, J., Fagoaga, N., Sarrazin, M., Hallett, J. P., Fennell, P. S., Barnabé, S., Labrecque, M., Brereton, N. J. B., & Pitre, F. E. (2021). Biorefinery potential of sustainable municipal wastewater treatment using fast-growing willow. *Science of The Total Environment*, 792, 148146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148146>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji : An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Simon, M., Zsuffa, L., & Burgess, D. (1990). Variation in N, P, and K status and N efficiency in some North American willows. *Canadian Journal of Forest Research*, 20, 1888-1893.
- Song, H., Che, Z., Cao, W., Huang, T., Wang, J., & Dong, Z. (2016). Changing roles of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a continuously acidifying soil caused by over-fertilization with nitrogen. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11964-11974. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6396-8>
- Stegmann, R. (2005). \* *Institute of Waste Management, Hamburg University of Technology, Harburger Schloßstr. 36, 21079 Hamburg, Germany* \*\* *Consultants for Waste Management, Prof. R. Stegmann und Partner, Nartenstraße 4a, D-21079 Hamburg,*

Germany ° IMAGE, Department of Hydraulic, Maritime, Environmental and Geotechnical Engineering, University of Padua, Via Loredan 20, 35131 Padova, Italy. 16.

Swanston, C., Homann, P. S., Caldwell, B. A., Myrold, D. D., Ganio, L., & Sollins, P. (2004). Long-Term Effects Of Elevated Nitrogen On Forest Soil Organic Matter Stability. *Biogeochemistry*, 70(2), 227-250.

Timoney, K. P., & Argus, G. (2006). Willows, water regime, and recent cover change in the Peace–Athabasca Delta. *Écoscience*, 13(3), 308-317. <https://doi.org/10.2980/i1195-6860-13-3-308.1>

Vermerris, W. (Éd.). (2008). *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-70805-8>

Voesenek, L. A. C. J., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes : An overview. *New Phytologist*, 206(1), 57-73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>

Wang, C., Xie, Y., He, Y., Li, X., Yang, W., & Li, C. (2017). *Growth and Physiological Adaptation of Salix matsudana Koidz. To Periodic Submergence in the Hydro-Fluctuation Zone of the Three Gorges Dam Reservoir of China*. 13.

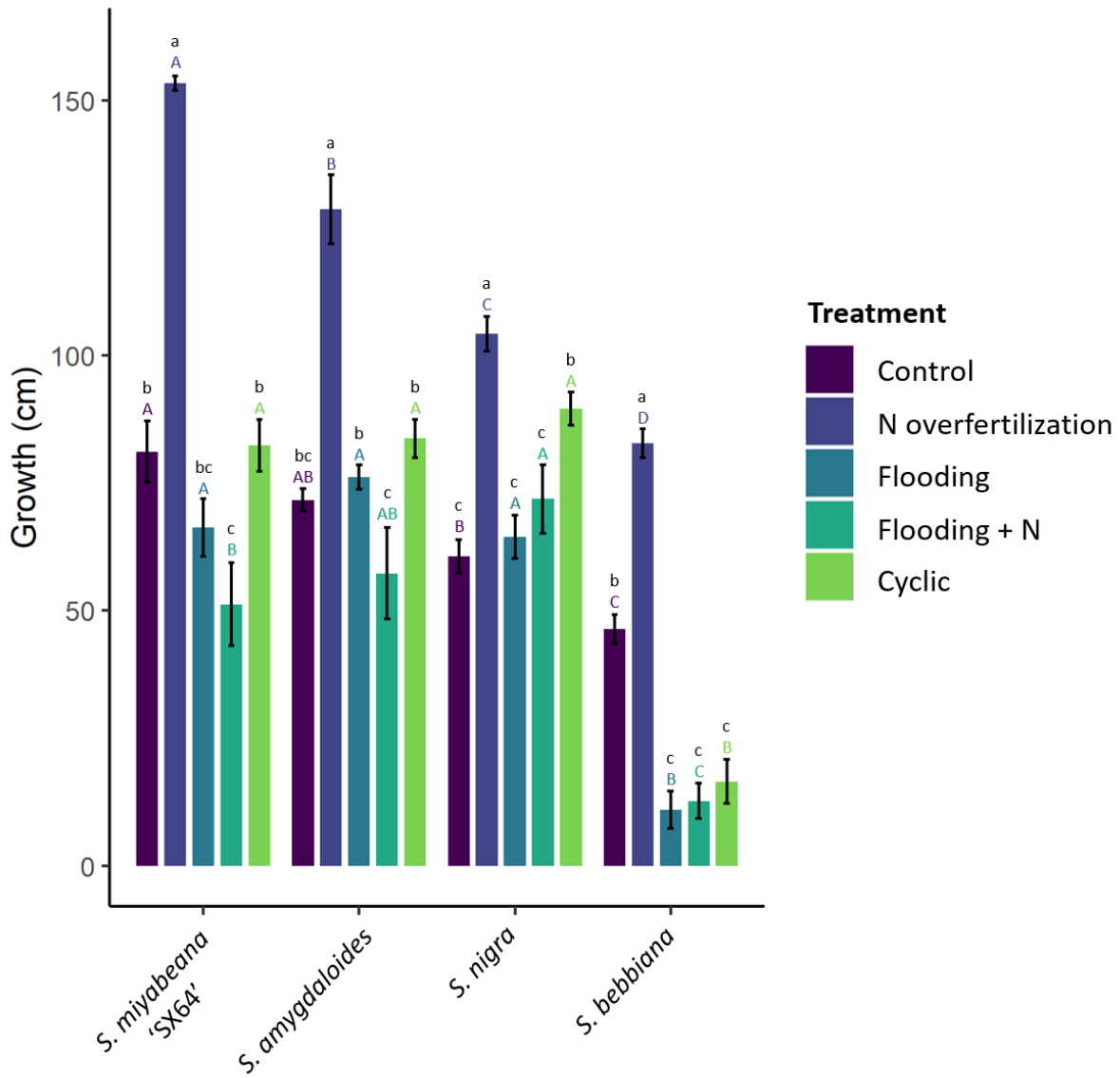
Weih, M., & Nordh, N.-E. (2002). Characterising willows for biomass and phytoremediation : Growth, nitrogen and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass and Bioenergy*, 17.

Wiszniewski, J., Robert, D., Surmacz-Gorska, J., Miksch, K., & Weber, J. V. (2006). *Landfill leachate treatment methods : A review*. 11.





## Annexe 1 - Supplementary material



**Figure 3. Growth of the four willow species under the five experimental treatments.**

Note: Different letters indicate a significant difference between the biomasses at  $p < 0.05$ . Different capital letters indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters indicate significant difference between treatments within the same species.

**Table 8. Mean values and standard deviation for aerial and roots biomass of the four willow species according to the different treatments.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<b>Aerial (Leaves + Stem) (mg)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	14.80 ± 1.17 cA	95.81 ± 11.01 aB	13.65 ± 1.63 cB	13.40 ± 2.78 cBC	30.82 ± 3.38 bB
<i>S. amygdaloides</i>	11.74 ± 0.66 cB	91.38 ± 5.11 aB	15.57 ± 1.15 cB	23.40 ± 7.33 bcB	31.13 ± 6.36 bB
<i>S. nigra</i>	12.03 ± 1.08 cB	120.51 ± 6.23 aA	19.95 ± 1.36 cA	53.69 ± 10.83 bA	62.83 ± 6.90 bA
<i>S. bebbiana</i>	7.12 ± 0.85 bC	30.77 ± 3.29 aC	1.83 ± 0.53 cC	1.89 ± 0.41 cC	2.26 ± 0.45 cC
<b>Roots (mg)</b>					
<i>S. miyabeana</i>	6.21 ± 0.91 bB	13.44 ± 2.43 aB	6.07 ± 1.08 bB	1.83 ± 0.64 cB	3.74 ± 0.65 bcB
<i>S. amygdaloides</i>	9.62 ± 1.06 bA	29.18 ± 9.50 aA	7.73 ± 1.28 bB	3.96 ± 2.17 bAB	4.57 ± 0.85 bB
<i>S. nigra</i>	8.30 ± 1.04 bAB	33.88 ± 3.20 aA	11.18 ± 0.77 bA	8.43 ± 3.67 bA	10.96 ± 1.58 bA
<i>S. bebbiana</i>	2.30 ± 0.24 bC	4.20 ± 0.47 aB	0.48 ± 0.18 cC	0.16 ± 0.06 cB	0.15 ± 0.04 cC

Note: Different letters indicate a significant difference between the biomasses at  $p < 0.05$ . Different capital letters indicate significant difference between species in response to each treatment. Different lower-case letters indicate significant difference between treatments within the same species.

## Annexe 2 – Tea bag index

The soil carbon stabilization factor (S) was determined by following the protocol for the tea bag index (TBI) (Keuskamp et al., 2013). During the transplantation of the willows at the Botanical Garden a bag of green tea (Tetley) and a bag of rooibos tea (Twinings) were weighted and buried in each of the pots at plantation. Those tea bags were collected at the end of the experiment and then washed, dried (70° C, 72 h) and weighed.

**Table 9. Stabilization factor for the different treatments of the experiment.**

	Control	N overfertilization	Flooding	Flooding + N	Cyclic
<b>Stabilization factor (S)</b>	0.159 ± 0.01 c	0.167 ± 0.01 bc	0.220 ± 0.01 a	0.238 ± 0.00 a	0.178 ± 0.01 b

Different letters indicate a significant difference at  $p < 0.05$ .

As for the other substrate properties (pH; Table 7), willow species did not influence the stabilization factor either (Table 9). Only the flooding influenced it. The "cyclic" treatment was the one with intermediate values compare to "flooding" and "flooding + N" (the highest) and "control" (the lowest).

Studies have shown that the addition of external nitrogen accelerates the decomposition of soil carbon and helps to stabilize it further (Neff et al., 2002; Swanston et al., 2004) with a greater proportion of litter humified (Prescott, 2010) that degrades more slowly and stabilizes carbon in the soil. In our study, although soil acidification was recorded because of fertilization regardless willow species or leachate application procedure (Song et al., 2016), the TBI approach (Keuskamp et al., 2013) allowed measurement of higher carbon stabilization factor even under intermittent flooding hence quantifying a supplemental ecosystemic service provided by leachate phytofiltration infrastructures.