

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

Par

Cassandre GAUDNIK

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

Spécialité : Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

IMPACTS DES DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE SUR LA
VEGETATION DES PRAIRIES ACIDES DU DOMAINE
ATLANTIQUE FRANÇAIS
- Approche comparative et expérimentale -

Soutenance le 6 décembre 2011

Devant la commission d'examen formée de :

M. PLANTUREUX Sylvain, Professeur INPL Nancy

Rapporteur

M. PORNON André, Maître de conférences Université Toulouse III

Rapporteur

Mme GALSOMIES Laurence, Ingénieur ADEME Paris

Examinatrice

M. LEADLEY Paul, Professeur Université Paris-Sud 11

Examineur

M. ALARD Didier, Professeur Université Bordeaux 1

Directeur de thèse

M. CORCKET Emmanuel, Maître de conférences Université Bordeaux 1

Co-directeur de thèse

Avant-propos

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres mêlant à la fois la rédaction en anglais d'articles scientifiques et la rédaction en français de résultats non soumis à publication au moment de la rédaction de la thèse. Ces chapitres sont accompagnés d'une introduction générale, de l'état de l'art sur le sujet et d'une conclusion générale, rédigés en français.

Cette thèse a été cofinancée sur une durée de trois ans par l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) et le conseil régional d'Aquitaine. La quatrième année a été soutenue par un poste d'A.T.E.R. à l'Université Bordeaux 1. Les recherches ont été appuyées par un programme européen BEGIN (Biodiversity of European Grasslands – the Impact of Atmospheric Nitrogen Deposition) de 2007 à 2010 soutenu par l'INRA. Le travail de recherche s'est déroulé au sein de l'UMR BIOGECO (Biodiversité, Gènes et Communautés) (INRA - Université de Bordeaux) dans l'équipe d'Ecologie des Communautés de l'Université Bordeaux 1 :

Université Bordeaux 1
UMR INRA 1202 Biodiversité, Gènes et Communautés (BIOGECO)
Equipe Ecologie des Communautés
Bâtiment B2 - Avenue des Facultés
33405 Talence

Remerciements

Cette thèse a été une expérience unique pendant laquelle j'ai eu l'occasion de découvrir de nouveaux paysages et de faire de belles rencontres à la fois à l'université mais également en dehors lors de manipulations et de congrès en France et à travers l'Europe.

Pour m'avoir accordé leur confiance et m'avoir soutenue, je tiens tout d'abord à remercier Didier Alard et Emmanuel Corcket qui ont partagé leur savoir-faire, leur connaissance et leur humour! Un grand MERCI à toi Didier de m'avoir donné ma chance dès mon master 2, moi qui n'avais jamais fait de botanique de ma vie! Je n'oublierai pas nos virées sur le terrain avec ton imbattable imitation du coucou et nos écoutes de Barbara sur la route.

Le travail de terrain (en plein cagnard ou les doigts gelés) fut essentiel durant la thèse et seule, je serais encore en train de couper mes brins d'herbes! Merci donc à toutes celles et tous ceux qui se sont succédés, année après année, pour m'aider sur le terrain et au laboratoire : Chantal, Chloé, Charlène, Louisa, Emilie, Louisa, Diane, Maude, Quitterie, Karen, Amandine, Marine et Séverine (que deviendrait la recherche sans les femmes ?) et Arnault, Loïc, Mathieu et Régis. Merci également à Bernard Clément et à Serge Muller, sans qui le terrain en Bretagne et dans les Vosges n'aurait pas été possible.

Je remercie aussi tous les membres de l'unité et spécialement les doctorants pour leurs présences et leurs discussions (scientifiques ou toutes autres !) au coin café, à l'apéro et de-ci de-là...

Je remercie les membres de mon comité de pilotage : Pierre Cellier, Laurence Galsomies, Sandrine Gombert, Anne Probst et Jean-François Soussana. Je leur suis reconnaissante du temps qu'ils m'ont consacré, de leurs remarques et de leur aide dans les différentes manipulations que j'ai voulu entreprendre.

Je tiens également à remercier Sylvain Plantureux et André Pornon d'avoir accepté de juger mon travail, ainsi que Paul Leadley d'avoir consenti à faire partie du jury.

Enfin, merci à mes parents et ma sœur adorée pour leur soutien et à Sylvain pour son réconfort et son aide dans la recherche de la potentille.

Ces remerciements témoignent, qu'au-delà du seul doctorant, une thèse est le résultat du travail et de l'implication de tout un groupe de personnes dont je suis sûre d'en oublier alors

Un grand merci à toutes et à tous pour votre aide!

Résumé

Afin d'appréhender l'impact des dépôts d'azote atmosphérique sur les écosystèmes, nous nous sommes intéressés à un écosystème d'intérêt patrimonial : les prairies acides du *Violion caninae*. Au sein de ces prairies, les objectifs étaient de (i) quantifier les variations floristiques temporelles et spatiales le long du domaine atlantique français et de déterminer si les variables de dépôts d'azote et du climat expliquaient ces patrons, (ii) comprendre les processus mis en jeu lors de l'enrichissement en azote au niveau de la végétation et du sol, et (iii) examiner les moyens potentiels de conservation et de restauration.

L'étude temporelle et spatiale des prairies acides a permis de mettre en évidence des changements de composition à l'échelle locale du type de communautés mais également à l'échelle nationale du domaine atlantique français. A l'échelle locale et nationale, ces changements ont pu être reliés à des changements climatiques d'augmentation de la température annuelle moyenne et de diminution de la disponibilité en eau du sol. Toutefois à l'échelle locale, les plus forts changements de végétation ont été perçus pour les sites soumis également aux plus forts dépôts chroniques d'azote depuis les 25 dernières années. Ces changements de composition se sont produits au détriment des espèces de petites tailles, telles que des dicotylédones, alors que les Poacées généralistes se sont maintenues en dominant le couvert végétal. Ces changements sont visibles dès 10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, déterminé comme la charge critique d'azote pour les prairies acides.

L'approche expérimentale a permis de souligner les processus mis en jeu dans ces habitats acides lors d'un apport d'azote. Notamment, l'enrichissement en azote n'entraînerait pas de compétition pour la lumière au sein de la végétation. Ce type de milieu, principalement défini par son caractère oligotrophe et sa faible capacité à neutraliser l'acidité du sol, semblerait donc essentiellement affecté par des mécanismes de toxicité de l'ammonium voire d'acidification du milieu à long terme.

Enfin, les moyens de restauration étudiés ont montré la difficulté de conserver et de restaurer de tels habitats potentiellement affectés par les dépôts d'azote. En effet, l'utilisation de fauches répétées avec exportation de la biomasse a montré son inutilité dans un système qui n'est pas influencé par la compétition pour la lumière. De même, l'étude des banques de graines a montré que ce pool d'espèces ne pouvait pas représenter le seul moyen de conservation des espèces caractéristiques. Ces résultats révèlent l'importance de conserver les prairies acides existantes, principalement dans des sites soumis à de faibles dépôts ambiants.

Mots clés : dépôts d'azote, prairie acide, composition floristique, rééchantillonnage, expérimentation, gestion, conservation, banques de graine

Abstract

The impacts of atmospheric nitrogen deposition on the vegetation of acid grasslands along the French Atlantic domain

- *Comparative and experimental approach* –

To assess the impact of atmospheric nitrogen deposition on ecosystems, we were focused on a patrimonial interest ecosystem: acid grasslands of *Violin caninae*. Within these grasslands, we aimed to (i) characterise temporal and spatial variation in plant species composition along the French Atlantic domain and determine if nitrogen deposition and climate variables could explain these patterns, (ii) understand processes underlined by nitrogen addition on vegetation and soil, and (iii) examine the potential conservation and restoration ways.

Temporal and spatial approach of acid grasslands brought to light changes in species composition at local scale of community type but also at the national French Atlantic domain scale. At both local and national scale, these changes were linked to climate change with increase of mean annual temperature and decrease of soil water availability. However at local scale, the most changes in species composition were experienced on sites with climate change and also the highest chronic nitrogen deposition since the last 25 years. These changes in species composition occurred at the expense of short stature species like forbs whereas grasses species were persistent and dominated vegetation. These changes are visible from 10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, determined as the critical load for nitrogen in acid grasslands.

The experiment allowed to highlight processes underlined in acid grasslands after nitrogen addition. In particular, nitrogen enrichment did not lead to light competition in vegetation. These grasslands, mainly defined by poor-nutrient and low capacity to buffer acidity in soil, were essentially affected by ammonium toxicity or even acidification on the long range.

Finally, the study of conservation ways showed the difficulty to conserve and restore the grasslands affected by nitrogen deposition. Indeed, more frequent cuttings with biomass removal were useless in a system not influenced by light competition within vegetation. The study of seed banks showed also that conservation ways could not be based just on seed banks to maintain characteristic species. These results highlight the importance to conserve the existing acid grasslands, mostly in region with low ambient nitrogen deposition.

Key words: nitrogen deposition, acid grassland, species composition, resampling, experiments, management, conservation, seed banks

Table des Matières

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
<i>CHAPITRE 1</i>	8
<i>CYCLE DE L'AZOTE ET DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE : PROCESSUS ET CONSEQUENCES SUR LES ECOSYSTEMES</i>	
1. Cycle biogéochimique de l'azote	10
2. Perturbation anthropique du cycle de l'azote : pollution par l'azote atmosphérique	20
3. Conséquences de l'enrichissement en azote dans les écosystèmes terrestres	29
<i>CHAPITRE 2</i>	45
<i>EMPREINTE DES DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE SUR LES PRAIRIES ACIDES DU DOMAINE ATLANTIQUE</i>	
<i>CHAPITRE 3</i>	77
<i>APPORTS EXPERIMENTAUX D'AZOTE SUR LES PRAIRIES ACIDES : EFFETS DE LA QUANTITE ET DE LA FORME D'AZOTE, REMEDIATION PAR LA FAUCHE</i>	
<i>CHAPITRE 4</i>	111
<i>CONSERVATION ET RESTAURATION POTENTIELLE DES PRAIRIES ACIDES : ETUDE DES BANQUES DE GRAINES</i>	
<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	137
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	145
<i>ANNEXES</i>	157

Table des Annexes

Annexe 1 _____ 158

Article 1: Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise

Environmental Pollution (2010) 158: 2940-2945, doi : 10.1016/j.envpol.2010.06.006

Annexe 2 _____ 174

Article 2: Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition

Carly Stevens, Cecilia Duprè, Cassandre Gaudnik, Edu Dorland, Nancy Dise, David Gowing, Albert Bleeker, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Vigdis Vandvik, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Per Arild Aarrestad, Serge Muller & Martin Diekmann

Journal of Vegetation Science (2011) 22: 207–215, doi : 10.1111/j.1654-1103.2010.01254.x

Annexe 3 _____ 192

Article 3: The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise

Environmental Pollution (2011) 159, 2243-2250, doi : 10.1016/j.envpol.2010.11.026

Annexe 4 _____ 213

Article 5: Addressing the impact of atmospheric nitrogen deposition on Western European grasslands

Carly Stevens, David Gowing, Katherine Wotherspoon, Didier Alard, Per Arild Aarrestad, Albert Bleeker, Roland Bobbink, Martin Diekmann, Nancy Dise, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, Suzanne Rotthier, Merel Soons & Emmanuel Corcket

Environmental Management (2011), 48, 885-894, doi : 10.1007/s00267-011-9745-x

INTRODUCTION GENERALE

DES CHANGEMENTS GLOBAUX AUX DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE

Depuis plusieurs décennies, l'impact des activités anthropiques s'est intensifié au point de se répercuter à l'échelle planétaire (Vitousek, 1994). Ces changements globaux concernent notamment le climat, l'utilisation des terres ainsi que les dépôts atmosphériques azotés qui altèrent de manière sensible la biodiversité au sein des écosystèmes terrestres (Sala *et al.*, 2000). Les activités anthropiques auraient ainsi conduit à l'extinction de 5 à 20 % des espèces de plantes ou d'animaux (Chapin *et al.*, 2000). Il apparaît donc nécessaire de comprendre la dynamique de la végétation en réponse à ces changements environnementaux.

Le changement climatique actuel est sans précédent de part la vitesse à laquelle il se produit et de part son origine anthropique. La température moyenne globale montre une augmentation de 0,74 °C au cours des 100 dernières années (IPCC, 2007). Ce réchauffement résulte en grande partie des émissions mondiales des gaz à effets de serre imputables aux activités anthropiques, tels que le dioxyde de carbone (CO₂), le méthane (CH₄) et l'oxyde nitreux (N₂O), dont l'augmentation est marquée depuis l'ère industrielle avec une hausse de 70 % environ entre 1970 et 2004. En conséquence, les continents et les océans montrent un réchauffement croissant de leur surface depuis le début du XX^{ème} siècle. Ce réchauffement joue un rôle notable à l'échelle globale dans l'évolution observée de nombreux systèmes physiques et biologiques. La physiologie, la phénologie et l'aire de répartition des végétaux est ainsi fonction de l'influence récente, mais non négligeable, des conditions environnementales actuelles (Hughes, 2000 ; Thuiller *et al.*, 2005). Malgré certaines politiques d'atténuation mises en place, les émissions mondiales de gaz à effets de serre continueront d'augmenter au cours des prochaines décennies. Les projections futures, basées sur des modèles de circulation générale atmosphérique, prévoient alors une hausse de la température moyenne de 1,8 °C à 4,0 °C entre la fin du siècle précédent et la fin de ce siècle.

Simultanément au changement climatique, les milieux subissent un changement d'utilisation des terres causé principalement par l'urbanisation, les infrastructures routières et l'agriculture. Dans ces conditions, le climat peut être modifié localement à travers la température, l'humidité et l'albédo, et plus globalement par l'émission dans l'atmosphère de gaz à effets de serre, les précipitations et la circulation des composés atmosphériques. Ce changement d'utilisation des terres présente également des effets sur le paysage par la fragmentation des habitats, qui peut altérer la dispersion des espèces spécialistes, causant leur raréfaction voire leur extinction locale. Malgré des initiatives pour faciliter la dispersion des espèces via des corridors, des pertes d'espèces ont déjà été observées dans le cas d'espèces dont la distribution est rare ou éparse, parfois à la limite de leur aire de distribution (Lavergne *et al.*, 2005 ; Ribeiro *et al.*, 2009).

Parallèlement au changement climatique et au changement paysager, les milieux sont confrontés à des modifications de dépôts d'azote atmosphérique. Naturellement, le cycle global de l'azote est équilibré par plusieurs processus, notamment la fixation biologique ou

chimique du diazote (N_2) non réactif en formes biologiquement assimilables et la dénitrification des nitrates (NO_3^-) en diazote (Galloway *et al.*, 1995). Mais, depuis le siècle dernier, l'équilibre de ce cycle est fortement perturbé par les activités anthropiques (Galloway *et al.*, 2008). L'agriculture, par la synthèse de fertilisants, et l'industrie et les transports, par la combustion d'énergies fossiles, sont respectivement responsables de l'augmentation des émissions azotées, sous forme réduite et oxydée. Si l'utilisation de fertilisants et la production d'énergie ont été bénéfiques pour le développement de la population humaine dès le début du XX^{ème} siècle, l'ampleur actuelle de la production d'azote réactif à l'échelle globale, avec des zones prédominantes telles que l'Europe, entraîne des effets sur la santé des hommes, des écosystèmes et du climat. L'azote, une fois émis, est transformé puis transporté à travers l'atmosphère et l'hydrosphère, pour se déposer au sein des écosystèmes terrestres et aquatiques, par des dépôts secs de gaz et de particules et des dépôts humides de particules combinées aux précipitations (Fagerli & Aas, 2008). Les conséquences de ces dépôts atmosphériques se traduisent par une augmentation des transferts chimiques de l'azote en formes assimilables par les organismes vivants. L'une des principales problématiques de l'augmentation temporelle et spatiale de cette pollution atmosphérique concerne son impact éventuel sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes terrestres, en touchant indifféremment tous les écosystèmes. En effet, en conditions naturelles, l'azote constitue un élément limitant pour la croissance des plantes dans de nombreux écosystèmes terrestres. Un apport additionnel de cet élément peut alors se traduire par un dérèglement du cycle biogéochimique conduisant à l'eutrophisation et à l'acidification du sol. Le mécanisme d'eutrophisation est considéré comme l'une des menaces essentielles sur la biodiversité des écosystèmes de la zone biogéographique atlantique (Vitousek *et al.*, 1997) particulièrement dans les prairies riches en espèces (Mountford *et al.*, 1993). La conservation de la biodiversité dans ces écosystèmes prairiaux nécessite donc une absence ou une réduction de la fertilité, qui ne serait pas due qu'aux pratiques agricoles, puisque les dépôts d'azote atmosphérique pourraient aussi expliquer les variations de biodiversité observées en prairies acides (Bobbink *et al.*, 1998 ; Stevens *et al.*, 2004). En effet, les prairies ont été identifiées comme les écosystèmes dont la biodiversité est la plus sensible aux changements globaux (Sala *et al.*, 2000). Ce mécanisme de réduction de la biodiversité, par les dépôts d'azote atmosphérique, représenterait alors une composante du changement global, jusqu'ici sous-estimée.

MODELE D'ETUDE : COMMUNAUTES DES PRAIRIES ACIDES

Comprendre les mécanismes de perte de diversité dans les écosystèmes et conserver la biodiversité nécessitent de caractériser les patrons de diversité et donc de structure et de fonctionnement des communautés végétales. De part l'intégration de facteurs biotiques et abiotiques, la communauté végétale représente un niveau d'organisation approprié pour caractériser les mécanismes, régissant la structure des communautés, et connaître la réponse des espèces face aux changements environnementaux actuels.

Les espèces peuvent s'associer en communauté, par différenciation de niche ou complémentarité des ressources, en exploitant grâce à leurs caractéristiques biologiques et phénologiques, les ressources sur des périodes différentes, des zones différentes ou encore des formes différentes. Chaque communauté est caractérisée par sa structure à travers le nombre d'espèces (richesse spécifique), le type et l'abondance des espèces (diversité spécifique), les caractéristiques physiques et les relations trophiques entre les populations. La communauté est également décrite par son fonctionnement comme par exemple les flux d'énergie, les cycles biogéochimiques, la productivité et les propriétés de résilience aux perturbations (Lavorel & Garnier, 2002 ; Eviner & Chapin, 2003). La structure d'une communauté, à un instant donné, dépend des adaptations et des réponses des organismes à l'environnement, ainsi que des interactions entre organismes puisque les communautés végétales intègrent les paramètres écologiques, à la fois abiotiques et biotiques. L'étude des changements de structure de la communauté rend compte de la dynamique de la végétation, déterminée en fonction de filtres sélectifs, tels que les interactions biotiques, les perturbations ou la disponibilité en ressources, qui limitent les espèces potentiellement capables de coexister. Dans ce manuscrit, l'étude s'est basée sur les espèces associées au sein des communautés de prairies acides, regroupées sous la classe des *Nardetea strictae*. Ces prairies se définissent comme des « formations herbues à *Nardus*, riche en espèces, sur substrat siliceux des zones montagnardes et des zones submontagnardes de l'Europe continentale » (Habitat 6230) (Bensettiti *et al.*, 2005).

Les prairies désignent un nombre de groupements herbacés hauts de composition variables et de valeurs fourragères très différentes. Dans la majorité des cas, il s'agit de prairies semi-naturelles permanentes, c'est-à-dire de formations secondaires maintenues anthropiquement par la gestion agricole. En Europe, les prairies occupent 80 millions d'hectares, soit 22 % de la superficie européenne, comprenant des terres destinées au pâturage, à la production de fourrage ou laissées en jachère, mais elles ont décliné durant ces dernières années du fait d'une reforestation (EEA, 2005). En France, les prairies occupent environ 20 % du territoire mais ont également diminué suite à l'urbanisation, l'intensification agricole ou, au contraire, la déprise agricole (IFEN, 2002). Pourtant, les prairies font partie d'une importante part du paysage européen, regroupant beaucoup d'espèces menacées. Parmi ces prairies, les prairies acides sont relativement bien distribuées à travers l'Europe et en France où elles se développent sur des substrats acidiphiles variés, dans des conditions oligotrophes, des zones collinéennes ou montagnardes atlantiques et subatlantiques. Ces systèmes extensifs représentent un ensemble de prairies avec une grande diversité typologique, qui sont parmi les plus remarquables sur le plan écologique de par leur richesse en espèces végétales, et sont à ce titre répertoriés au sein de la directive Habitat Natura 2000. De part le caractère oligotrophe de leur substrat, correspondant à une faible fertilité du sol, la richesse spécifique dans les prairies acides suppose un maintien de cette faible fertilité du milieu. De plus, le caractère acide du sol suppose que ce type de prairies soit d'avantage sujet à des mécanismes d'acidification du sol que d'autres types de prairies. Il est donc à prévoir

que ces prairies riches en espèces pourraient être affectées par les apports croissants d'azote atmosphérique eutrophisants et acidifiants (Ellenberg, 1988). En outre, dans les régions atlantiques, les pelouses acidiphiles sèches à mésophiles apparaissent le plus souvent en contexte de landes où elles forment des communautés dynamiques difficiles à analyser, et se font rares dans les régions où les surfaces forestières dominent. En effet, cet habitat de valeur patrimoniale élevée est en voie de régression suite à l'intensification agricole mais également par la déprise agricole (Haines-Young *et al.*, 2003 ; Stevens *et al.*, 2011d, annexe 4, article 5) et il est donc d'intérêt majeur de préserver les prairies acides qui subsistent, en évitant tout autre effet néfaste, même involontaire, tel que la pollution atmosphérique azotée.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

A l'heure actuelle, les études examinant l'impact des dépôts d'azote atmosphérique sur la biodiversité des milieux sont encore peu nombreuses. Il est donc nécessaire de compléter ces études, principalement sur des milieux à forts enjeux de biodiversité, tels que les prairies acides, en mettant l'accent sur les espèces sensibles et sur certains processus clés à l'interface de la végétation et du sol. Dans ce sens, le projet européen BEGIN (Biodiversity of European Grasslands – the Impact of Atmospheric Nitrogen Deposition) a été mené en collaboration avec plusieurs pays européens de climat atlantique de la Norvège à la France, de 2007 à 2009. A travers ce projet, cette thèse s'inscrit dans la problématique générale visant à appréhender la réponse des communautés végétales à l'augmentation des dépôts d'azote atmosphérique, en s'organisant autour de quatre chapitres. Le premier chapitre présente un état de l'art des connaissances acquises sur le cycle de l'azote en intégrant les dépôts d'azote atmosphérique et leurs conséquences sur les écosystèmes. Les résultats obtenus, développés du deuxième au quatrième chapitre, s'efforcent de répondre aux questions de recherche suivantes :

- *Au sein d'un même type de prairie acide, quelles sont les variations floristiques temporelles et spatiales et quels sont les facteurs globaux, entre les dépôts d'azote et le changement climatique, qui peuvent les expliquer?*

Cet objectif est l'objet du deuxième chapitre à travers une approche comparative, à la fois dans le temps et l'espace, de la dynamique des communautés végétales des prairies acides. Cette approche consiste en un rééchantillonnage de 25 prairies acides du *Violion caninae*, au sein du large domaine atlantique français, sur les trente dernières années, et réalisé le long d'un gradient modéré de dépôts d'azote atmosphérique.

- *Quels sont les processus impliqués dans les dépôts d'azote atmosphérique qui expliqueraient les patrons observés dans les communautés végétales?*

Cet objectif est développé dans le troisième chapitre à travers une approche expérimentale variant les quantités d'azote total ainsi que la forme d'azote, oxydée et réduite, appliquée sur

la végétation. Cette approche vise à éclaircir les processus mis en jeu lors de l'addition d'azote, au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés de prairies acides.

- *Comment restaurer les habitats d'intérêt, tels que les prairies acides, potentiellement dégradés par les dépôts d'azote atmosphérique?*

Les moyens de restauration sont étudiés à la fois dans le troisième chapitre où l'approche expérimentale croise différents régimes de fauche, en exportant la biomasse, avec la quantité d'azote total appliquée et dans le quatrième chapitre qui explore, le long d'un gradient de gestion, les banques de graines, persistante et transitoire, comparées à la végétation établie au sein des prairies.



Prairies dans le contexte actuel des dépôts d'azote atmosphérique

CHAPITRE 1

CYCLE ET DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE : PROCESSUS ET CONSEQUENCES SUR LES ECOSYSTEMES

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme »

Lavoisier, *Traité élémentaire de chimie*, 1789.

Pour survivre, se développer et se reproduire, les plantes ont besoin de ressources, c'est-à-dire de matière première ou source d'énergie naturelle, telles que l'énergie lumineuse, l'eau et les nutriments disponibles dans le sol, essentiellement l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) ainsi que d'autres macro- et micro-éléments. L'acquisition par les plantes de la matière organique, contenant plus de 40% de carbone, est conditionnée par la transpiration stomatique, faisant de l'eau la ressource la plus limitante pour la productivité végétale. Au niveau nutritif, l'azote est considéré comme le principal élément limitant la croissance des plantes (Chapin, 1980; Aerts & Chapin, 2000). Cet élément chimique essentiel à la vie est utilisé par les êtres vivants pour former un grand nombre de composés organiques. Chez les végétaux, c'est le quatrième élément d'importance rapporté à leur masse sèche. Il est essentiel pour le métabolisme des organismes vivants en tant que constituant essentiel de nucléotides, de lipides membranaires, d'acides aminés et donc des protéines enzymatiques et de structure (Marschner, 1995; Aerts & Chapin, 2000). Chez les végétaux, l'azote foliaire est présent à 75% dans les chloroplastes (Poorter & Evans, 1998) dont 50% au sein de protéines photosynthétiques (Hikosaka & Terashima, 1996). Il existe donc une forte relation entre la capacité photosynthétique des plantes et leur concentration foliaire en azote. Dans la plupart des écosystèmes naturels ou semi-naturels, l'azote est le principal facteur limitant la croissance des plantes, et spécialement dans des conditions dites oligotrophes et mésotrophes (Vitousek & Howarth, 1991), suivi du phosphore et du potassium. La limitation de la croissance des plantes par l'azote s'explique de part sa faible disponibilité alors que les besoins de la plante en azote sont très élevés, notamment pour l'appareil photosynthétique (Hikosaka & Hirose, 2001). Cependant, ces dernières décennies, l'utilisation intensive de fertilisants dans les systèmes agricoles et l'augmentation des dépôts azotés sur les écosystèmes naturels et semi-naturels ont diminué le caractère limitant de cet élément.

Pour comprendre comment l'azote affecte le fonctionnement des écosystèmes et prévoir les futures réponses à l'augmentation de la disponibilité en azote, il est nécessaire de connaître précisément les processus impliqués dans le cycle de l'azote. Ce chapitre fournit une vue d'ensemble du cycle de l'azote, à l'échelle des écosystèmes terrestres, avant de s'intéresser aux modifications anthropiques de ce cycle et aux conséquences pour les écosystèmes.

1. CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DE L'AZOTE

Le cycle de l'azote décrit les processus biochimiques ou chimiques de transformation de cet élément en assurant une circulation rapide dans les différents compartiments de l'écosystème. Ce cycle est complexe en raison du grand nombre de transformations de l'azote dans l'environnement et de la difficulté pour les êtres vivants à l'incorporer.

1.1. Formes d'azote dans l'écosystème

L'azote peut se trouver sous forme moléculaire (diazote : N_2), organique ou minérale incluant des gaz et des aérosols, c'est-à-dire des particules, solides ou liquides, en suspension dans l'air (Tableau 1.1). Ces composés sont transformés par oxydation ou réduction, suite à des processus chimiques ou biologiques, faisant varier leur degré d'oxydation, par exemple : +5 (HNO_3), +4 (NO_2), +3 (HNO_2), +2 (NO), +1 (N_2O), 0 (N_2); -3 (NH_3 , NH_4^+).

Alors que les organismes vivent au sein d'une atmosphère constituée majoritairement de diazote, la force de la triple liaison, qui relie les deux atomes de N, rend ce composé indisponible pour la plupart des êtres vivants. L'adaptation des végétaux à utiliser efficacement cet élément dépend donc de micro-organismes, qui ont acquis la capacité de convertir le diazote, non réactif, en azote réactif (N_r) au cours de l'évolution. Le terme « azote réactif » inclut ici tous les composés azotés actifs de manière biologique, photochimique ou radiative dans l'environnement, en incluant des formes inorganiques réduites (ammoniac : NH_3 , ammonium : NH_4^+) ou oxydées (NO_y dont les oxydes d'azote NO_x : NO et NO_2) et organiques (urée, acides aminés, protéines, acides nucléiques). L'azote réactif, issu principalement de la fixation chimique et biologique de l'azote dans le sol, est redistribué dans la biosphère par la sénescence de la flore et de la faune et par les feux de forêts (van Egmond *et al.*, 2002 ; Galloway *et al.*, 2004). L'azote réactif est utilisé par les plantes selon trois voies possibles : (i) la décomposition de la matière organique par les micro-organismes du sol, (ii) la fixation biologique de l'azote par des organismes fixateurs de diazote atmosphérique et (iii) l'application de l'azote réactif sous forme de fertilisants inorganiques.

1.2. Localisation de l'azote dans l'écosystème

Les différentes formes azotées sont réparties dans trois compartiments principaux constitués par l'atmosphère, le sol et l'eau associée et la biomasse (Tableau 1.1). L'atmosphère contient la plus grande réserve mondiale d'azote, sous forme de N_2 , qui représente 78% de l'atmosphère en volumes moléculaires, soit $3,9 \cdot 10^{12}$ Tg ($1 \text{ Tg} = 10^{12} \text{ g}$), mais compte également des formes réactives présentes à l'état d'aérosols ou de gaz. En comparaison, la quantité dans le sol ($1,3 \cdot 10^5$ Tg N) est bien moindre que dans l'atmosphère mais plus importante qu'au sein de la biomasse microbienne ($2 \cdot 10^3$ Tg N) ou végétale ($1 \cdot 10^3$ Tg N). Le sol joue donc un rôle clé dans le cycle de l'azote des écosystèmes terrestres en tant que réservoir principal, mais cet élément est principalement lié à la matière organique. En effet, dans les écosystèmes naturels, seule une faible quantité ($1-10 \text{ kg N ha}^{-1}$) est disponible, sous forme de NH_4^+ ou de NO_3^- , à l'inverse des systèmes fertilisés ($10-200 \text{ kg N ha}^{-1}$).

Tableau 1.1. Exemples de composés azotés selon leur forme et leur localisation en distinguant, dans l'atmosphère, les gaz (en italique) et les aérosols (en gras)

Compartiment	Forme	Exemple de composés azotés		
Atmosphère	Non réactive	N₂ (diazote)		
	Réactive	minérale	oxydée	NO (monoxyde d'azote) NO₂ (dioxyde d'azote) N₂O (protoxyde d'azote) <i>HNO₂</i> (acide nitreux) <i>HNO₃</i> (acide nitrique)
			totale	NH₄NO₃ (nitrate d'ammonium)
		organique	réduite	NH₃ (ammoniac) <i>NH₄₊</i> (ammonium)
				Amines, urée, acides aminés, protéines
Terrestre Aquatique	Réactive	minérale	oxydée	<i>NO₂⁻</i> (nitrite) <i>NO₃⁻</i> (nitrate)
			réduite	<i>NH₃</i> <i>NH₄⁺</i>
Végétation		organique		Matière fraîche et sèche, humus Urée, acide urique, acides aminés, bases acides nucléiques

1.3. Transformation de l'azote dans l'écosystème

Jusque dans les années 90, la connaissance du cycle de l'azote était basée sur des principes selon lesquels (i) la minéralisation est l'étape limitante du cycle, (ii) les plantes ne prélèvent l'azote que sous forme inorganique et (iii) les plantes n'entrent pas en compétition avec les micro-organismes du sol pour utiliser l'azote (Schimel & Bennett, 2004). Mais la perception du cycle de l'azote a récemment évolué puisque des études ont montré que (i) l'étape de minéralisation se décompose en une phase de dépolymérisation des macromolécules en matière organique dissoute biodisponible puis une phase d'ammonification de cette matière organique dissoute, en considérant l'étape de dépolymérisation comme la phase limitante du cycle de l'azote, (ii) les plantes peuvent également prélever l'azote sous forme organique et (iii) il existe des phénomènes de compétition pour l'azote entre les plantes et les micro-organismes du sol (Figure 1.1).

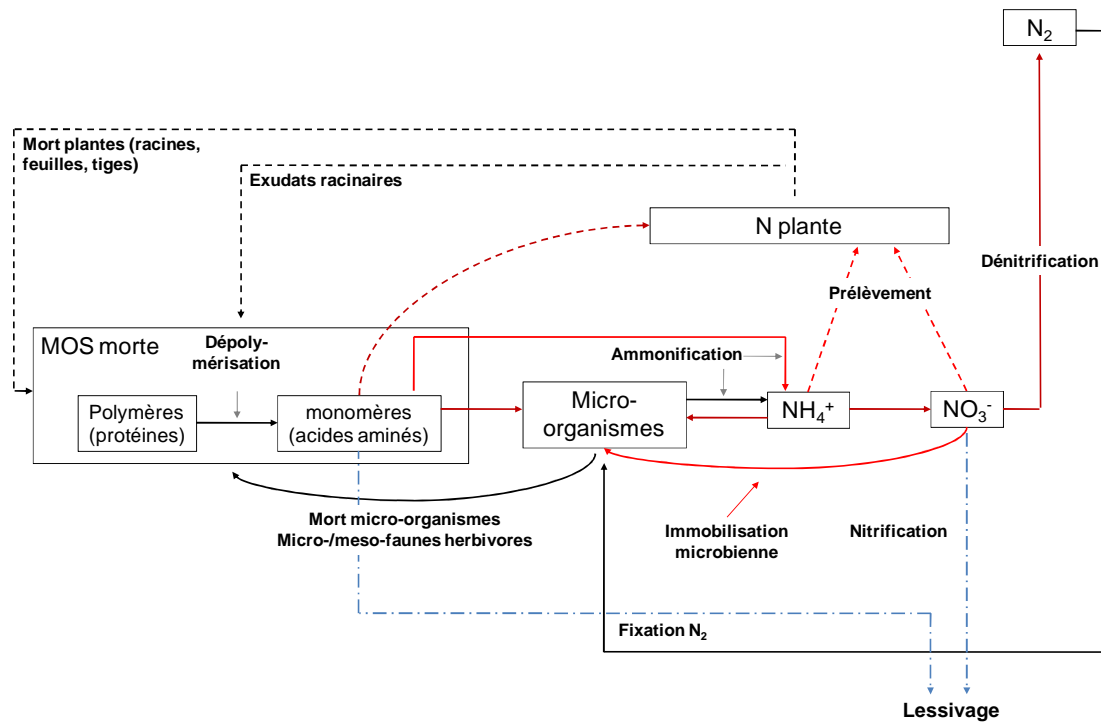


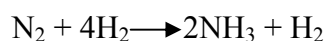
Figure 1.1. Schéma des processus majeurs du cycle de l'azote au sein de l'écosystème, incluant les voies de rétention interne: les processus pilotés par les plantes (flèches en pointillés), par les micro-organismes (flèches pleines), les processus compétitifs entre plantes et micro-organismes (flèches rouges), et les transferts hydrologiques (flèches bleues). MOS : matière organique du sol (d'après Rennenberg *et al.*, 2009).

1.3.1. Fixation de l'azote atmosphérique

Suite à la fixation naturelle de diazote, par oxydation chimique ou par assimilation par des micro-organismes spécialisés libres ou symbiotiques, l'azote est rendu assimilable pour les plantes. Le diazote atmosphérique représente donc la source majeure de production de substances protéiques essentielles au développement des plantes (Cleveland *et al.*, 1999).

Une très faible fraction de N_2 est rendue assimilable par voie physico-chimique (Tableau 1.2). Les éclairs et la lumière ultraviolette peuvent transformer N_2 en monoxyde d'azote (NO) alors oxydé en dioxyde d'azote (NO_2), puis en acide nitrique (HNO_3) qui atteint le sol par les précipitations ou sous forme de particules sèches sur lesquelles il a été adsorbé dans l'atmosphère. Cependant, cet apport d'azote, de 1 à 10 kg N $ha^{-1} an^{-1}$, reste minoritaire et se trouve surtout important dans les régions tropicales et montagneuses (Prather *et al.*, 2001).

Ainsi le processus majoritaire de fixation est la fixation biologique naturelle de N_2 (Tableau 1.2). L'origine de ce processus se confond avec l'apparition de la vie sur terre, il y a 3,5 milliards d'années (Karl *et al.*, 2002). Cette fixation est surtout connue sur les continents où elle permet à la vie de se développer dans des milieux initialement pauvres en nitrate. La fixation du diazote est limitée aux procaryotes qui possèdent, à l'inverse des plantes, un complexe enzymatique, la dinitrogénase, qui catalyse la réduction suivante:



Les organismes fixateurs comprennent à la fois des procaryotes symbiotiques ou libres, tels que des bactéries hétérotrophes, aérobies (*Azotobacter*) et principalement anaérobies (*Clostridium*), ainsi que des bactéries autotrophes (*Rhodospirillum*) très répandues dans le sol, sur la surface des feuilles et des écorces. Les systèmes symbiotiques des légumineuses sont relativement bien compris alors que des méconnaissances persistent sur la fixation par des cyanobactéries symbiotiques ou des bactéries libres hétérotrophes. Il est donc difficile d'établir avec précision leur taux de fixation N_2 même si leur contribution est supposée importante. Mais les plus puissants fixateurs sont les bactéries symbiotiques de végétaux supérieurs, tels que le genre *Rhizobium* symbiotiques des Fabacées, pouvant fixer jusqu'à 200 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Smil, 1999). Ces bactéries se développent dans le sol avoisinant la plante et colonisent les poils absorbants en induisant des nodules. 20 % de l'azote ainsi fixé dans les nodules est transféré à la plante, qui fournit en échange des glucides aux bactéries, et 80 % est émis dans le sol après la mort et la décomposition des nodules. Dans des conditions normales, les organismes fixateurs profitent donc de l'azote sans qu'il y ait excrétion de composés azotés, mais à leur mort et après humification, l'azote est mis à disposition des végétaux fournissant en moyenne 25 kg N ha⁻¹ an⁻¹ au niveau des continents. Dans la plupart des écosystèmes, les organismes fixateurs conduisent ainsi à l'accumulation de composés azotés dans le temps, menant à un apport proche de l'équilibre avec d'autres ressources limitantes (Vitousek *et al.*, 2002). Ce processus est alors suffisant pour maintenir le stock de composés azotés dans l'écosystème et reconstituer les pertes. D'ailleurs, à l'époque préindustrielle, ce processus représentait la voie principale de création d'azote réactif dans les écosystèmes terrestres et c'est encore le cas dans les écosystèmes « vierges » (Cleveland *et al.*, 1999) même si la fixation d'azote anthropique est de plus en plus importante. Ainsi en Europe, la culture des Fabacées représentent 3,3% de la surface européenne mais 7% des dépôts d'azote par ces organismes fixateurs (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Apport actuel global et européen de l'azote au niveau de la biosphère en Tg (1Tg= 10¹² g) (en parenthèse : les pourcentages du budget total d'azote) (d'après Erisman *et al.*, 2005).

	Monde	Europe
	Tg N (%)	Tg N (%)
Fixation N biologique	90 (24)	14,8 (27)
Fixation N chimique	5 (1)	0,1 (0)
Fixation N océans	140 (37)	-
Sous total fixation naturelle	235 (62)	14,9 (27)
Fixation N industrielle	85 (23)	21,6 (40)
Fixation N cultures	33 (9)	3,9 (7)
Importation nourriture animale	-	7,6 (14)
Combustion industrielle et transport	21 (6)	6,1 (11)
Sous total fixation anthropique	140 (38)	39,2 (73)
Total	375	54,1

En effet, le diazote atmosphérique est également fixé industriellement par le procédé Haber-Bosch, qui synthétise du NH_3 par hydrogénation du N_2 atmosphérique à des températures et pressions très élevées (Erisman *et al.*, 2008). Ce procédé, mis au point dès 1913, a facilité la production de fertilisants agricoles à une échelle industrielle, augmentant de manière sans précédent la productivité agricole globale. Ainsi, les activités anthropiques ont augmenté considérablement l'apport azoté dans les milieux (Vitousek *et al.*, 1997), avec un taux de fixation anthropique de l'azote supérieur à la fixation naturelle aussi bien au niveau européen qu'au niveau mondial, en ne considérant pas la fixation océanique (Tableau 1.2).

1.3.2. Décomposition et minéralisation

Le cycle se poursuit au niveau des décomposeurs du sol puisqu'une partie des composés azotés, maintenue dans la biomasse, est sans cesse restituée au milieu sous forme de matière organique morte, contenue dans la litière et autres déchets, excréta et cadavres. La production de litière et la décomposition représentent les éléments clés du stockage et de la libération de l'azote réactif à partir de la matière organique du sol (Figure 1.1).

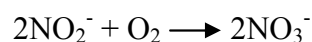
La décomposition, correspondant à la dépolymérisation de la matière organique, est réalisée par des enzymes extracellulaires de bactéries et de champignons (Jackson *et al.*, 2008). Ces micro-organismes convertissent ensuite l'azote organique dissous en NH_4^+ , lors de l'ammonification, correspondant à la minéralisation de la matière organique. Ce processus est peu spécifique, réalisé par un grand nombre de micro-organismes réducteurs, bactéries aérobies (*Bacillus*, *Pseudomonaceae*) ou anaérobies (*Clostridium*) (Jarvis *et al.*, 1996), mais spécialisé dans la forme d'utilisation de l'azote organique. L'azote ammoniacal produit est utilisé à la fois par les plantes, en pénétrant dans les racines, et les micro-organismes, tels que les bactéries nitrifiantes ou bien adsorbé aux colloïdes du sol et rester à disposition des plantes et des micro-organismes.

1.3.3. Nitrification : nitrosation et nitratisation

La nitrification se réalise en deux étapes par des bactéries autotrophes et certains champignons (Costa *et al.*, 2006; Wrage *et al.*, 2001) : (i) Oxydation par les bactéries nitrosantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*) réalisant la nitrosation :



(ii) Oxydation par des bactéries nitratantes (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*) réalisant la nitratisation :



Les études se sont essentiellement portées sur l'étape de nitrosation qui est l'étape limitante lors de la nitrification. La nitrification est un processus aérobie strict, par conséquent les formes d'azote réduit s'accumulent dans les sols mal drainés et mal oxygénés. Ce processus est également affecté par le contenu en eau, avec un optimum en eau du sol entre 30 et 60% (Bouwman, 1998), mais aussi par la température, avec un optimum vers 37°C, et le

pH avec un optimum à pH 5,5-6,5 (Machefert *et al.*, 2002). Selon les milieux, le taux moyen d'azote nitrique varie de 50 à 100 kg ha⁻¹. La probabilité que l'azote nitrifié soit immobilisé par les micro-organismes est moindre que l'azote ammonifié, puisque l'azote est incorporé aux membranes cellulaires uniquement sous forme réduite (Glass *et al.*, 2002). Même si les micro-organismes du sol préfèrent assimiler NH₄⁺, en raison de coûts énergétiques moindres, l'immobilisation microbienne de NO₃⁻ peut-être conséquente dans les écosystèmes semi-naturels dont le sol n'est pas perturbé (Burger & Jackson, 2003) (Figure 1.1).

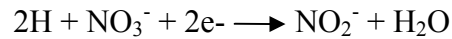
1.3.4. Prélèvement et assimilation par les végétaux

Les plantes, incapables de réduire N₂ atmosphérique, prélèvent l'azote du sol pour satisfaire leurs besoins nutritifs, qui dépendent de la phénologie de la plante. Les plantes absorbent directement NH₄⁺ ou NO₃⁻ selon les disponibilités dans le sol (Figure 1.1) mais le pH a une grande importance dans l'assimilation des différentes formes d'azote. L'absorption de NH₄⁺ est un phénomène passif par échange de proton (H⁺), acidifiant le sol, alors que l'absorption de NO₃⁻ est un mécanisme actif de cotransport avec H⁺. Du fait de son effet alcalin dans le sol, l'assimilation de NO₃⁻ est favorisée lors d'une baisse de pH, toutefois la formation de NO₃⁻ par la nitrification est inhibée en conditions très acides. Les plantes peuvent également absorber des composés azotés organiques via de petites molécules comme, les acides aminés, mais avec un rendement inférieur aux formes minérales (Näsholm *et al.*, 2009; Rennenberg *et al.*, 2009). L'acquisition d'azote organique dépend de la mycorhization qui soutient 80% des plantes (van der Heijden *et al.*, 2008 ; Meyer *et al.*, 2010).

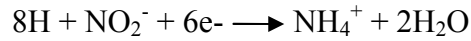
Le premier produit stable de la fixation de l'azote, NH₃, est protoné aux pH physiologiques pour former NH₄⁺. Cet azote ammoniacal est, avec l'azote organique, la forme qu'utilisent préférentiellement la plupart des champignons et reste une forme très assimilable pour les végétaux supérieurs. Bien que NH₄⁺ soit facilement disponible pour de nombreuses plantes, soit en tant que produit de la fixation de N₂, soit en tant qu'élément adsorbé au sol, il peut être également très toxique pour les plantes. En effet, la plupart des plantes sont sensibles aux fortes concentrations en NH₄⁺, connu pour provoquer au niveau cellulaire, un déséquilibre ionique, un changement du pH cytoplasmique, des cycles futiles, des interférences énergétiques et une inhibition de la dinitrogénase (Britto & Kronzucker, 2002). Par conséquent, les plantes peuvent difficilement se permettre d'accumuler un excès de NH₄⁺ libre et évitent tout risque de toxicité en l'incorporant rapidement dans les acides aminés ou les bases azotées des acides nucléiques.

Sauf dans des situations extrêmes, NO₃⁻ est la forme azotée la plus abondante dans le sol et la plus disponible pour les plantes. Les cellules racinaires, n'ayant jamais été en contact avec NO₃⁻, présentent une faible capacité d'absorption de NO₃⁻, suggérant une faible expression d'un transporteur constitutif. Au contraire, la présence de NO₃⁻ dans le sol stimule sa vitesse d'absorption, indiquant un transporteur membranaire induit. Une fois absorbé, NO₃⁻

peut être directement assimilé ou bien réduit par la nitrate réductase (NR), induite en présence de NO_3^- et de lumière et réalisant la première étape d'assimilation par réduction du nitrate en nitrite :



Le NO_2^- produit migre dans les plastes racinaires ou les chloroplastes foliaires pour être réduit en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR) :



L'absorption de NO_3^- par les racines est sensible aux basses températures, aux conditions anaérobies et aux inhibiteurs de la respiration et de la synthèse protéique. Ainsi, la réduction de NO_3^- est synchronisée avec l'activité photosynthétique, capable de fournir l'énergie nécessaire ainsi que les squelettes carbonés indispensables à l'incorporation de NH_4^+ . La proportion de NO_3^- réduit dans les racines ou dans les feuilles est également régulée par la concentration de NO_3^- dans le sol. A faible concentration, la majorité de NO_3^- est réduite dans les racines et les acides aminés formés sont transportés dans les parties aériennes alors qu'à forte concentration, l'assimilation de NO_3^- dans les racines devient limitante et une forte proportion de NO_3^- est assimilée dans les feuilles, formant du NH_4^+ rapidement assimilé. La matière organique produite est alors restituée au milieu, sous forme de litière et autres déchets, pour y être minéralisée lors de l'ammonification et poursuivre le cycle de l'azote.

1.3.5. Assimilation et stratégie des espèces

Une fois acquises, les ressources sont stockées ou investies dans la production de nouveaux organes, intervenant à leur tour dans l'acquisition de ressources stockées ou réinvesties. La capacité des plantes à se procurer et à utiliser les ressources du milieu est donc primordiale pour la fitness des plantes (taux de survie, croissance et fécondité) (Bloom *et al.*, 1985; Westoby *et al.*, 2000). Pour optimiser les potentialités de leur habitat, les plantes ont développé des stratégies d'acquisition des ressources adaptées à leur environnement. Les milieux fertiles sont ainsi souvent constitués d'espèces à fort potentiel de croissance alors que les sites peu fertiles sont composés essentiellement d'espèces à faible productivité (Chapin, 1980; Aerts & Chapin, 2000). En effet, les plantes, dotées d'une forte efficacité d'utilisation de l'azote pour la photosynthèse, ont également un fort potentiel de croissance et peuvent ainsi occuper des milieux productifs et perturbés (Hikosaka, 2004). Au contraire, les espèces dont l'efficacité d'utilisation de l'azote pour la photosynthèse est faible, vivent généralement dans des milieux stressants où la disponibilité en azote est faible. Ces espèces se caractérisent par une faible capacité photosynthétique avec une faible proportion et une distribution inefficace de l'azote dans l'appareil photosynthétique puisque les enzymes photosynthétiques, telles que la RuBisCO, ne servent que de protéines de stockage de l'azote (Warren & Adams, 2004). Les ressources étant communes et nécessaires à toutes les plantes, ces dernières rentrent donc en concurrence pour leur acquisition. Dans le cadre de la théorie de la niche écologique (Chase & Leibold, 2003), ce type d'interaction biotique négative, définie comme la compétition pour les ressources du milieu, est un processus clé pour expliquer la

coexistence des espèces (Grime, 1979 ; Tilman, 1982). Toutefois, l'approche neutraliste explique la coexistence des espèces par des mécanismes stochastiques de dispersion des espèces à la base de leur dynamique (démographie, spéciation, extinction) (Hubell, 2001).

Pour maintenir leur population dans un environnement, chaque espèce végétale a ainsi pu développer une « stratégie » définie comme « un ensemble de caractéristiques génétiques similaires ou analogues qui apparaissent fréquemment chez différentes espèces et populations, et qui leur confèrent des ressemblances écologiques » (Grime, 1979). Les stratégies, fondées sur la notion de compétition végétale, sont basées sur le niveau des ressources, particulièrement la lumière, l'eau et les nutriments. D'une part, le modèle C-S-R repose sur les variations de stabilité de l'habitat et de potentiel de croissance des plantes (Grime, 1977) dans lequel le stress, opposé à la productivité, et la perturbation, opposée à la stabilité de l'habitat, sont les facteurs du milieu qui limitent la production de biomasse des plantes. Les plantes sont dissociées selon trois types de stratégie: les compétitrices (C) dans des milieux peu stressants et peu perturbés, les tolérantes au stress (S) dans les milieux très stressants et peu perturbés, et enfin les rudérales (R) dans les milieux peu stressants et fortement perturbés. Dans ce modèle, la compétition totale augmente lorsque les contraintes abiotiques, engendrant un stress, et la perturbation diminuent. D'autre part, le modèle sur la compétition des ressources, « Resource Ratio Hypothesis », explique l'exclusion et la coexistence des espèces par leur exigence nutritive minimale et leur taux de consommation des ressources (Tilman, 1982). L'espèce tolérant le plus faible niveau de ressource, telle que l'azote, et diminuant le niveau de cette ressource du milieu sera la plus compétitive en atteignant un état d'équilibre où le taux de prélèvement de la ressource équivaut au taux de perte. Ainsi, la coexistence des espèces est possible par des compromis dans les capacités compétitives des espèces pour l'ensemble des ressources du milieu, puisque les espèces ne peuvent pas être compétitives pour toutes les ressources. Ces modèles caractérisent d'une part l'intensité de la compétition (Grime, 1979) et d'autre part le type de compétition, aérienne ou souterraine, (Tilman, 1982) avec des espèces répondant différemment à la compétition en fonction des contraintes du milieu, telles que la disponibilité en nutriments. Dans les milieux peu fertiles, comme les milieux acides, le facteur limitant est naturellement la teneur totale en nutriments qui engendre une forte intensité de compétition souterraine entre les plantes (Tilman, 1982). En revanche, dans les milieux fertiles, la production de biomasse des plantes entraîne une réduction de la disponibilité de lumière au sol et augmente ainsi la compétition aérienne pour la lumière qui aurait pour conséquence de réduire la biodiversité du milieu (Grime, 1979).

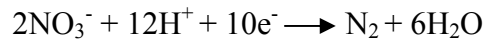
1.3.6. Pertes de l'azote

Plusieurs processus naturels exportent l'azote hors du milieu terrestre, expliquant la limitation persistante de cet élément dans la plupart des écosystèmes naturels avec de faibles apports azotés (Vitousek & Howarth, 1991). Les pertes d'azote peuvent avoir lieu sous forme réduite, lors de la volatilisation de NH_3 , et sous forme oxydée, puisque les produits de la

nitrification de NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^- , sont susceptibles d'être perdus par réduction en gaz, via la dénitrification, ou par lixiviation (Figure 1.1).

La volatilisation de l'azote ammoniacal correspond à une perte par voie gazeuse de NH_3 , résultant de la transformation de NH_4^+ en solution en NH_3 gazeux. Elle se produit lors de l'accumulation de N ammoniacal (NH_3 gaz et NH_4^+ solide) près ou à la surface du sol. Cette volatilisation est très variable selon les milieux puisqu'elle dépend des conditions du sol (pH, capacité d'échange, humidité du sol) et des conditions climatiques locales (précipitations, températures, vitesse du vent, humidité de l'air). Dans les écosystèmes naturels, il y a très peu d'azote ammoniacal puisque sa transformation en NO_3^- et son absorption par les plantes sont plus rapides que sa formation à partir de la matière organique. Ainsi, les pertes de NH_3 dans l'atmosphère sont presque nulles. En revanche, dans les sols agricoles, cet équilibre est rompu par l'apport de fortes quantités d'azote ammoniacal, sous forme de fumiers et de fertilisants, qui provoque des pertes de NH_3 importantes (Oenema *et al.*, 2009).

La dénitrification correspond à l'utilisation de NO_3^- , comme accepteur final d'électrons, dans un processus respiratoire bactérien (*Pseudomonas*) dans lequel les nitrates sont réduits en une forme gazeuse azotée, N_2O ou N_2 (Figure 1.1). Les étapes limitantes de la dénitrification sont les premières étapes qui impliquent la rupture de liaisons N-O :



Dans les sols riches en nitrates et en carbone et en conditions anaérobies, comme dans les milieux ou zones humides, cette réaction se produit avec une perte atteignant 20% du contenu en azote, même si le taux de dénitrification est difficilement quantifiable (Barton *et al.*, 1999).

La lixiviation des nitrates se produit lors de l'écoulement vertical de l'eau de pluie à travers le sol (percolation), lorsque l'eau de drainage se charge en nitrates entraînés en profondeur, hors de la zone de prélèvement des racines (Figure 1.1). La faculté des nitrates à être lixiviés est due à leur charge négative, qui ne leur permet pas d'être retenus par les colloïdes du sol chargés négativement. Ainsi, la capacité d'échange anionique du sol est faible. Les cations, tels que NH_4^+ , bénéficient eux de forces de liaisons importantes aux colloïdes du sol. En France, sous un climat atlantique, la quasi-totalité des réserves nitriques du sol peut être perdue à l'automne et surtout en hiver, lorsque l'évapotranspiration du couvert végétal est faible. Cette perte est d'autant plus importante que le stock de nitrates du sol est élevé, traduit par un faible rapport C:N dans le sol, que la pluviométrie hivernale est forte et que la capacité de rétention en eau du sol est faible (Dise *et al.*, 2009).

Le cycle et les quantités de composés azotés présentes dans le sol et la végétation varient considérablement selon le type d'écosystème et l'utilisation du milieu. Dans les systèmes agricoles, le cycle de l'azote est dominé par la fertilisation azotée et le cycle des cultures tandis que dans les écosystèmes naturels et semi-naturels, ce cycle est surtout déterminé par les conditions climatiques, édaphiques et paysagères, ainsi que par la quantité de composés azotés apportée via la fixation biologique et les dépôts atmosphériques.

2. PERTURBATION ANTHROPIQUE DU CYCLE DE L'AZOTE : POLLUTION PAR L'AZOTE ATMOSPHERIQUE

Le terme de pollution regroupe un ensemble de mécanismes et d'actions dont la conséquence est une dégradation de l'environnement. Selon la Loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie de 1996, la pollution atmosphérique est définie comme « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». Cette définition prend en compte les actions anthropiques qui perturbent le cycle naturel de l'azote en libérant dans l'atmosphère de l'azote réactif, sous forme minérale ainsi qu'une faible contribution de composés organiques. Pour évaluer les effets de la pollution par l'azote atmosphérique, il est nécessaire de prendre en compte les émissions, les transports et les transformations chimiques, correspondant à des valeurs de concentrations des polluants, et enfin les retombées sur les écosystèmes, correspondant à des valeurs de dépôts, en distinguant les composés réduits et oxydés ayant des conséquences différentes de part les processus distincts qu'ils subissent.

2.1. Emissions de composés azotés dans l'atmosphère

2.1.1. Ammoniac

Les activités agricoles représentent la source dominante d'émissions de NH_3 (Bouwman *et al.*, 1997). En Europe de l'Ouest, ces activités contribuent entre 85 et 100% des rejets atmosphériques (Anderson *et al.*, 2003 ; Sutton *et al.*, 2000) et en France, 98% des émissions anthropiques de NH_3 sont liées à la production agricole, les 2% restantes étant émises par l'industrie et le transport (Serveau *et al.*, 2011) (Figure 1.2). Les émissions françaises sont donc causées principalement par l'élevage, du fait des déjections animales à 76% et des cultures à 20%. En France, ces émissions ne présentent pas de tendance significative au cours des 30 dernières années alors qu'une légère tendance décroissante est observée en Europe sur la période 1990-2003 (-1,4% par an), d'après les données EMEP.

L'émission provenant des déjections animales est un processus physique qui se produit à partir de surfaces humides (Elzing & Monteny, 1997). Même si les déjections animales ne représentent pas une source directe d'azote, l'hydrolyse de l'urée, en présence d'uréase dans le milieu, produit de l'azote organique. Une fois ces composés organiques décomposés et minéralisés, NH_3 formé peut se protonner en NH_4^+ , qui possède une forte affinité avec la solution du sol, ou se volatiliser vers l'atmosphère. Cette volatilisation est la conséquence d'un gradient de NH_3 qui s'établit à l'interface déjection-atmosphère, dont la dispersion de NH_3 se produit par diffusion suite au gradient de concentration ou par

convection sous l'action du vent. Les sources d'émissions découlent donc des points sources, des bâtiments d'élevage et lieux de stockage du fumier et du lisier, de l'application de fumier et de fertilisant minéral sur les cultures, du pâturage et d'autres sources incluant les plantes. Les différences régionales dépendent des méthodes de production et des pratiques agricoles, tandis que les variations temporelles, selon les jours et les saisons, dépendent de la météorologie. L'importance des émissions est donc liée au contenu ammoniacal total (NH_3 et NH_4^+), au pH, à la température et à la vitesse du vent.

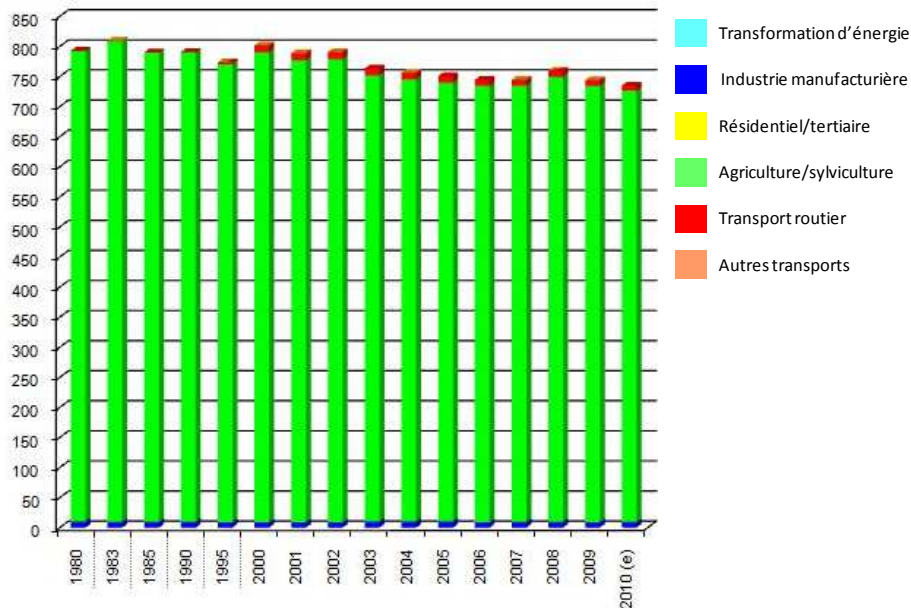


Figure 1.2. Emissions atmosphériques de NH_3 en France métropolitaine en kt avec une estimation préliminaire (e) pour 2010 (Serveau *et al.*, 2011).

2.1.2. Oxydes d'azote

Dans les zones urbaines et industrielles, les oxydes d'azote (NO_x), NO et NO_2 , sont générés par des phénomènes de combustion à hautes températures, à partir du N_2 atmosphérique, et émis dans l'atmosphère principalement sous forme de NO et dans une moindre mesure, 5 à 20%, de NO_2 . L'Europe contribue à 14% environ des émissions globales de NO_x , basées sur l'année 2000, c'est à dire moins que l'Amérique du Nord ou l'Asie (Figure 1.3a). Le secteur d'activité responsable de la plus grande partie des émissions de NO_x en Europe est de loin les sources de combustion mobiles, à hauteur de 62%, comprenant le transport routier, d'autres sources mobiles et le transport international, suivi des combustions stationnaires dues aux centrales électriques et aux combustions résidentielles et tertiaires (Figure 1.3b). En France, la domination des émissions par le transport routier (54%) est également observée (Figure 1.4). Toutefois, ces inventaires ne prennent pas en compte les émissions naturelles, du fait de la faible contribution des sources naturelles.

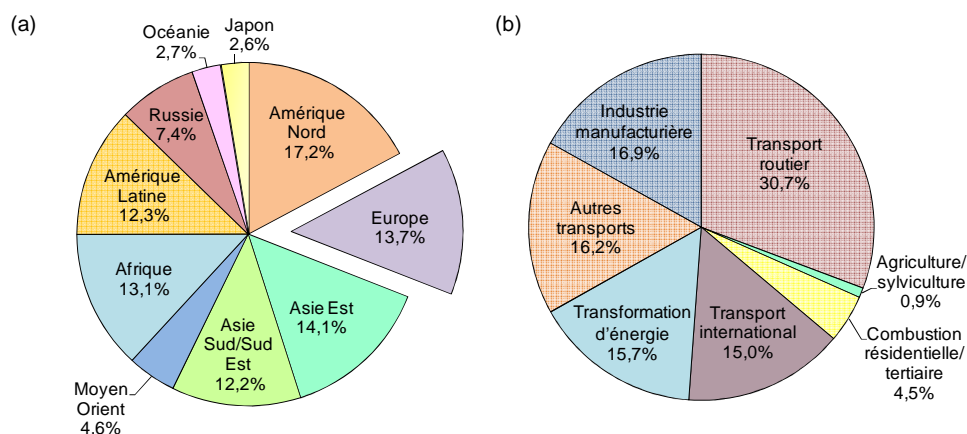


Figure 1.3. Contribution des émissions de NO_x par différentes régions du monde (a) et différentes sources (b) basée sur l'inventaire EDGAR (Emission Database for Global Atmospheric Research) de l'année 2000.

Les émissions tendent à diminuer à la fois en Europe (-34% de 1990 à 2005), et France (-37% entre 1990 et 2009 ; -4% entre 2008 et 2009) (Figure 1.4), du fait de législations sur des nouvelles valeurs limites d'émissions à respecter dès 2008 (directive sur les Grandes Installations de Combustion) et sur l'amélioration des équipements de véhicules. Toutefois, l'objectif 2010 prévu par la directive plafonds d'émissions nationaux (810 kt), n'a pas été atteint en France et nécessite un renforcement des mesures de réduction. En effet, les études d'émissions se sont surtout portées sur des pays d'Europe du nord, dotés d'un système d'inventaire avec une haute résolution spatiale (1-5 km) nécessaire pour contrôler les composés azotés, tel NH₃, dont les dépôts sont proches des sources d'émission alors qu'en France, la résolution spatiale des inventaires et les informations sur les pratiques agricoles sont insuffisantes.

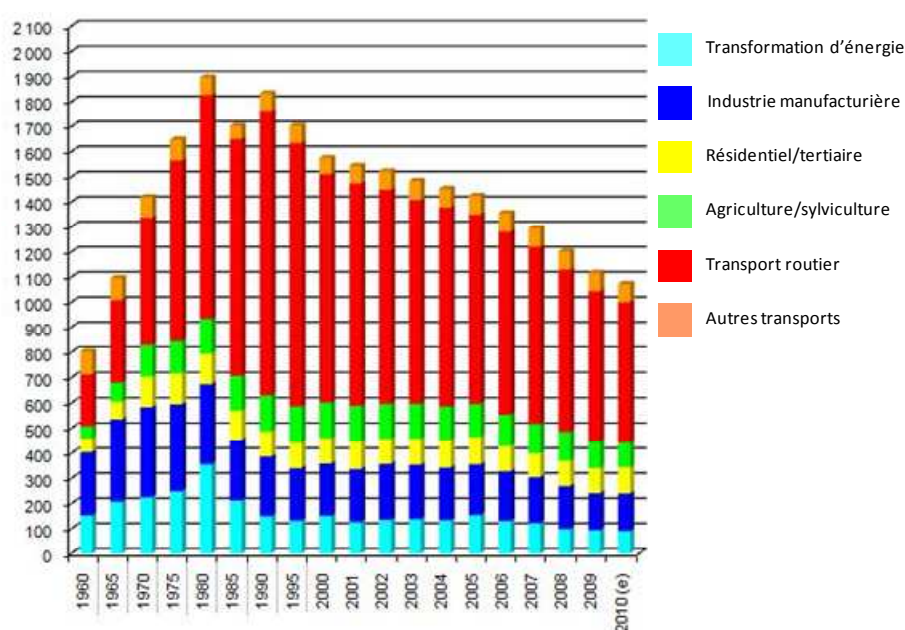


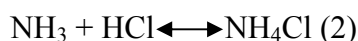
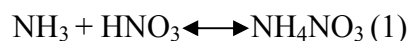
Figure 1.4. Emissions atmosphériques de NO_x en France métropolitaine en kt avec une estimation préliminaire (e) pour 2010 (Serveau et al., 2011).

2.2. Transformation des composés azotés dans l'atmosphère

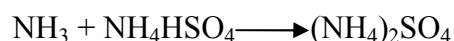
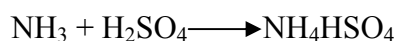
La réactivité des composés azotés est liée aux processus de transformation de l'azote réactif dans l'atmosphère. Les polluants émis directement par une source sont dit primaires et leur concentration dans l'air est donc maximale à proximité de leur source et tend à diminuer en s'en éloignant, du fait de leur dilution dans l'atmosphère. Mais les polluants peuvent également évoluer chimiquement après leur émission pour se transformer et produire de nouveaux polluants dits secondaires. De nombreux facteurs influencent la formation des espèces secondaires, tels que la concentration en oxydants gazeux et dissous, la solubilité de l'oxydant dans l'eau, le pH et la force ionique de la solution, la présence d'éléments traces (Fe^{3+} , Mn^{2+}) agissant comme des catalyseurs, la température et l'humidité relative.

2.2.1. Réactions entre l'ammoniac et d'autres composés atmosphériques

L'ammoniac est une source de formation d'aérosols secondaires lors de réaction entre des formes gazeuses de NH_3 et des acides. Cependant, l'ammoniac peut aussi se condenser sur des particules atmosphériques existantes. Etant l'un des seuls constituants basiques, il réagit avec des polluants acides, tels que l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide nitrique (HNO_3) ou l'acide sulfurique (H_2SO_4), pour conduire à un équilibre entre la phase gazeuse et la réaction produisant des aérosols sous forme de sels d'ammonium, du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (1) ou du chlorure d'ammonium NH_4Cl (2) :



Comparativement à la formation de NH_4NO_3 , la formation de NH_4Cl s'effectue dans une moindre mesure : la concentration atmosphérique de NH_4Cl représentant un cinquième de la concentration en NH_4NO_3 . Tandis que l'acide chlorhydrique est un polluant primaire émis par les incinérateurs d'ordures ménagères, l'acide nitrique est le principal polluant secondaire de l'oxydation des NO_x . Les réactions (1) et (2) sont réversibles et leur équilibre dépend des conditions météorologiques alors que la réaction en deux étapes de NH_3 avec l'acide sulfurique est considérée comme irréversible (Hov *et al.*, 1994) :



L'ammoniac atmosphérique est rapidement converti à 50% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uniquement limité par le réactif le moins abondant, et l'excès d'ammoniac forme du NH_4NO_3 . Cependant, la diminution des émissions de SO_2 , suite aux mesures prises pour diminuer les causes du phénomène des pluies acides, a entraîné une baisse actuelle de la formation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ce qui explique la modification de la présence dans l'air de NH_4^+ particulaire envers NH_3 gazeux. Les phases gazeuses et particulaires ont des propriétés chimiques et physiques différentes : les aérosols, ayant une durée de vie plus longue, sont transportés sur des distances plus importantes. En effet, en raison de sa grande réactivité avec d'autres composés gazeux, les concentrations en NH_3 ne sont très élevées qu'à proximité de leurs sources alors que les sels

d'ammonium, comme NH_4NO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ont des petites tailles, qui rendent leur vitesse de dépôt très faible et augmentent leur transport dans l'atmosphère sur plusieurs centaines voire milliers de kilomètres.

2.2.2. Chimie des composés oxy-azotés (NO_y) dans l'atmosphère

La contribution de NO et NO_2 dans l'atmosphère est fortement dirigée par l'ozone (O_3) qui réagit très rapidement avec NO pour former du NO_2 . Par la suite, NO_2 peut se dissocier par photolyse pour former à nouveau du NO et un composé oxygéné qui reforme de l' O_3 (Fowler *et al.*, 1998). Les potentiels de formation ou de destruction de l'ozone sont liés à la distribution spatio-temporelle des NO_x , qui dépend du transport et de la chimie des composés azotés, non seulement des NO_x mais aussi des composés azotés oxydés inorganiques et organiques qui modulent les concentrations en NO_x . Ces composés azotés organiques (nitrates organiques : PAN, PPN) subissent une dégradation thermique qui mène à la formation de NO_2 mais ces processus sont encore très peu étudiés (Figure 1.5). Cependant, la réaction la plus importante des NO_y émis au niveau du sol reste la conversion très rapide ($5\% \text{ h}^{-1}$) de 50 à 75% des NO_y dans l'atmosphère en HNO_3 (Figure 1.5).

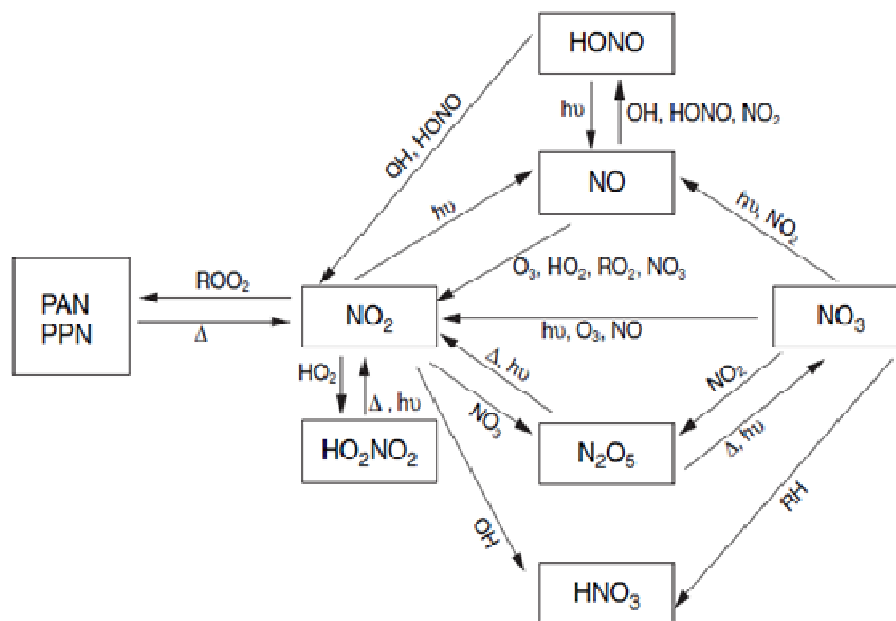


Figure 1.5. Interactions principales entre les différents composés oxydés de l'atmosphère (Δ : énergie thermique ; hu : photolyse ; RH : hydrocarbure ; PAN : peroxy acetyl nitrate ; PPN : peroxy propionyl nitrate) (Derwent & Hertel, 1998).

2.3. Processus de dépôts d'azote

Les composés azotés, gazeux et particulaires, subissent dans l'atmosphère une série de processus chimiques et physiques, qui aboutit à leur élimination de l'atmosphère et à leur retombées au sol par deux processus : les dépôts humides et les dépôts secs (Figure 1.6).

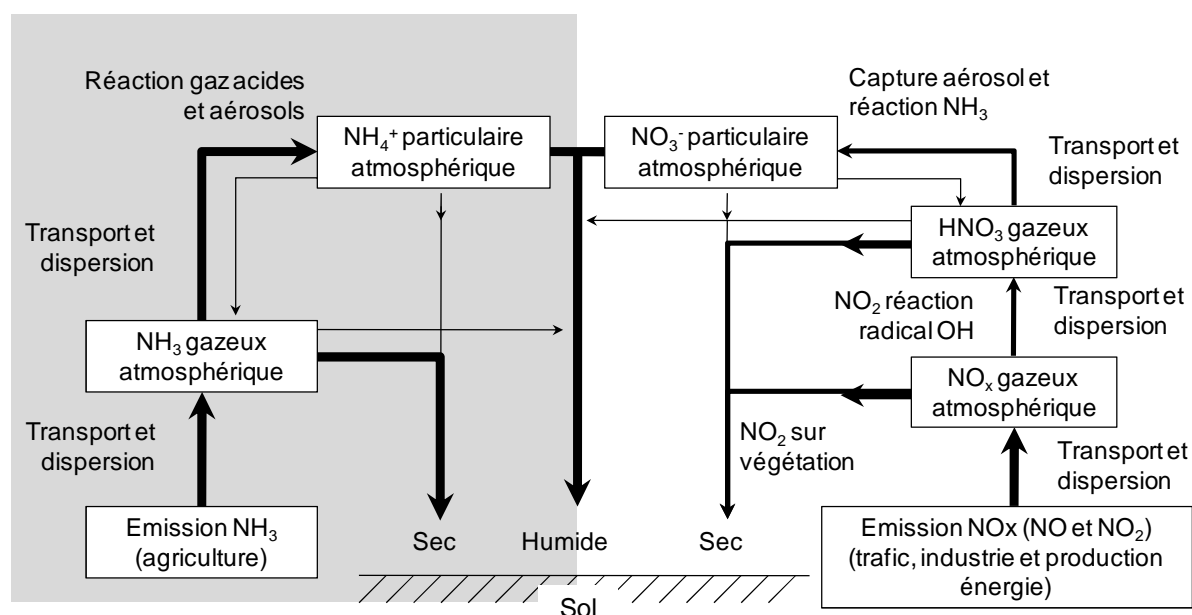


Figure 1.6. Passage de l'azote réactif dans l'atmosphère avec, à gauche, les voies atmosphériques des composés d'azote réduit (phase gazeuse : NH_3 et phase particulaire : NH_4^+) et, à droite, les voies des composés d'azote oxydé, NO_x et leurs produits de réaction (phase gazeuse : NO , NO_2 , HNO_3 et phase particulaire : NO_3^-). L'épaisseur des flèches traduit l'importance de la voie utilisée (Hertel *et al.*, 2006).

2.3.1. Dépôts secs

Les dépôts secs consistent en des dépôts directs, de gaz ou d'aérosols, à la surface terrestre sans présence de précipitation. Ce processus fait intervenir la sédimentation gravitationnelle des composés azotés et leur capture par des obstacles, tels que la surface du sol, la végétation ou les océans. Ce type de dépôts représente un phénomène continu, gouverné à la fois par les concentrations en gaz ou particules, les processus de déplacement dans la couche limite turbulente, la nature chimique et physique des espèces azotées et leur capacité d'absorption. Ce processus peut être comparé à une série de résistances à travers les différentes couches de l'atmosphère jusqu'à la surface du sol ou de la plante (Monteith & Unsworth, 2008). Il est inversement fonction de cette résistance, connue sous le terme de vélocité, dépendant de paramètres tels que la vitesse du vent et la viscosité de l'air.

Les composés gazeux d'azote réactif considérés dans le processus de dépôt sec sont NH_3 , HNO_3 et NO_2 (Figure 1.6). Dans les zones agricoles, ces dépôts secs sur la végétation semi-naturelle sont dominés par NH_3 qui peut pénétrer dans le sol, se déposer sur la végétation, ou bien être réémis. Au niveau de la végétation, la direction et l'intensité des échanges stomatique de NH_3 avec l'atmosphère dépendent de la différence de concentrations entre l'atmosphère et la cavité sous stomatique, cette dernière étant appelée le point de compensation stomatique (Asman *et al.*, 1998). Ce point de compensation résulte donc de l'équilibre thermodynamique entre NH_3 dissous dans l'apoplasme et NH_3 gazeux contenu dans la cavité sous-stomatique. Le processus de dépôt sur la végétation se réalise selon deux voies : le jour, la voie stomatique bidirectionnelle et contrôlée par le point de compensation

stomatique et la nuit, la voie de surface des feuilles comprenant les échanges entre la plante et l'eau de surface. Tout comme NH_3 , HNO_3 a une contribution importante dans les dépôts, au niveau des zones exposées aux émissions de NO_x puisque ce composé est hautement soluble et se dépose très rapidement par sa faible surface de résistance. En revanche, les dépôts de NO_2 , restent faibles de part la solubilité de NO_2 inférieure à celle de HNO_3 ou NH_3 , même si la résistance stomatique à ce composé est souvent faible (Hertel *et al.*, 2011).

Le processus de dépôts secs de particules diffère de celui des gaz du fait de l'importance de la taille des particules impliquées qui affecte la diffusion, l'interception ou la sédimentation et du fait de l'influence de la résistance de surface, qui devient négligeable dans le cas de particules de faibles diamètres. En effet, dans le cas de particules inférieures au micron, le phénomène de dépôt est plus ou moins similaire à celui des gaz mais en comparaison aux dépôts gazeux, les dépôts de particules sur la végétation sont généralement négligeables. Cependant, ce phénomène continu pourrait être sous-estimé au niveau de surfaces irrégulières, telles que les forêts.

2.3.2. Dépôts humides

Les dépôts humides correspondent à un processus indirect de lavage de la colonne atmosphérique par des précipitations, sous forme liquide ou solide, qui représentent les vecteurs de transport des polluants jusqu'à la surface terrestre. Ce processus consiste en l'incorporation d'un constituant au sein d'une goutte de pluie par deux mécanismes : le « rain-out » et le « wash-out ». Le « rain-out » ou « capture nuageuse », résulte de la capture des constituants, gaz solubles ou particules, par les gouttes de pluie au sein même du nuage en formation tandis que le « wash-out » ou « lessivage de la colonne atmosphérique », est le piégeage des constituants, lors d'évènements pluvieux, entre le nuage et le sol, soit par capture à la suite de collision, soit par entrainement de l'air déplacé lors de la chute des gouttes de pluie (NEG-TAP, 2001). En effet, les petites particules de faible inertie évitent les gouttes de pluie qui déplacent de l'air en tombant, ce qui explique que le nombre de collisions soit plus important dans le cas de grosses particules.

Ce processus de dépôts humide, et notamment le « rain-out », est le plus efficace pour prélever des composés gazeux ou particulaires d'azote réactif de l'atmosphère car le mécanisme de « wash-out » n'est responsable que de 10 à 20% en moyenne des dépôts humides bien que cela dépende des quantités d'azote présentes dans les nuages et dans l'air environnant (Figure 1.6). En ce qui concerne les aérosols, l'azote est principalement présent sous forme de NH_4^+ ou de NO_3^- bien que certains composés organiques soient aussi présents. La plupart des aérosols correspondent à des faibles tailles (0,1 à 1,0 μm de diamètre) et sont donc incorporés par « rain-out » ou « wash-out » principalement par nucléation, correspondant à une condensation, et dans une moindre mesure par diffusion ou par impactation (Pruppacher & Jaenicke, 1995). Les voies décrites s'appliquent également aux

composés gazeux en fonction de leur solubilité et de leur réactivité. Les composés gazeux, tels que NH_3 et HNO_3 , sont très efficacement absorbés par les nuages et les précipitations du fait de leur solubilité élevée alors que, NO et NO_2 , qui sont peu solubles, représentent une faible proportion des dépôts humides (Hertel *et al.*, 2011).

2.4. Echelle d'étude de la pollution azotée

Le phénomène de pollution azotée concerne différentes échelles. A chaque échelle, les polluants impliqués ne sont pas identiques et diffèrent notamment par leur dynamique physico-chimique et leur durée de vie dans l'atmosphère, variant d'une seconde pour les entités les plus réactives à plusieurs années pour les plus stables. Les variations spatiales et temporelles des concentrations en polluants sont fonction des conditions atmosphériques de dilution, liées aux cycles diurnes et saisonniers, au rythme et au lieu de source des émissions et à la nature des polluants.

La pollution locale, dite pollution de proximité, est principalement due à des polluants dont la durée de vie est assez courte dans l'atmosphère, de l'ordre de quelques heures. Cette pollution est distribuée très irrégulièrement dans le paysage dépendant des sources locales, de la topographie et des conditions météorologiques locales en particulier du vent. Cette pollution concerne essentiellement NH_3 , issu de l'agriculture dans les zones rurales, et les NO_x , issus de la combustion et du trafic routier dans les zones urbaines et industrielles.

La pollution régionale, dite pollution de fond, caractérise les problèmes observés sur des zones distantes de plusieurs centaines de kilomètres de leur lieu d'émission. Cette pollution dépend non seulement des émissions de polluants primaires mais également de la formation de polluants secondaires et notamment de l'ozone par réactions photochimiques. Elle englobe la volatilisation de NH_3 , suite au stockage et à l'épandage des déjections animales, qui se dépose dans un rayon d'une centaine de kilomètres, et les réactions des NO_x avec O_3 pendant plusieurs jours. Elle concerne particulièrement les pluies acides, l'eutrophisation et la pollution photochimique (Berge *et al.*, 1999).

La pollution azotée peut également s'étendre à l'échelle continentale ou mondiale. A cette échelle, le lieu d'émission importe peu puisque tous les composés émis s'accumulent dans l'atmosphère et y persistent pendant plusieurs dizaines voire centaines d'années avec des répercussions planétaires. Deux phénomènes principaux ont été mis en évidence à cette échelle : la destruction de l'ozone stratosphérique et le dérèglement climatique dû à l'augmentation des gaz à effet de serre dont le N_2O , qui a une durée de vie de 114 ans. Pour répondre à ce problème, des mesures internationales ont été adoptées via la « Convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance » (CLRTAP) (Genève, 1979). Cette convention a pour objectif de limiter, réduire et prévenir ce type de pollution en fixant des obligations de réduction des émissions de polluants, tels que les NO_x . Les négociations se sont

poursuivies jusqu'en 1999, à Göteborg, avec la signature d'un huitième protocole relatif à la réduction de l'acidification et de l'eutrophisation. Ce protocole, dit également « multi-polluants – multi-effets », se fonde sur la notion de « charge critique », c'est-à-dire sur la vulnérabilité des écosystèmes à l'acidification et à l'eutrophisation, due à l'enrichissement en azote, du fait des dépôts de polluants atmosphériques. Il a été complété par une directive européenne (directive 2001/81) plus restrictive avec des objectifs de réduction de 54% des NO_x et de 4% de NH_3 , entre 1990 et 2010, qui n'ont pas été atteints. Si l'émission des NO_x a tout de même significativement diminué durant cette période (Figure 1.5), il est remarquable que la France, déjà premier contributeur des émissions de NH_3 en Europe en 1990, le soit resté en 2010, mais de surcroît ait augmenté son pourcentage de contribution aux émissions européennes en dépassant les 25%.

2.5. Détermination des dépôts d'azote atmosphérique

Créés à la fin des années 70, les réseaux internationaux de surveillance des dépôts atmosphériques, tels que EMEP (European programme for the Monitoring and Evaluation of long range air Pollutants), ont permis de mieux connaître l'évolution spatio-temporelle des dépôts et de développer la modélisation des phénomènes impliqués. En effet, la Convention CLRTAP a été suivie de plusieurs programmes, dont le programme EMEP en 1984. Ce programme a pour but de fournir aux gouvernements signataires, dont la France, des informations pour supporter le développement et l'évaluation des protocoles internationaux visant la réduction des émissions. Ses principaux objectifs sont de collecter des données d'émissions européennes et d'établir des inventaires, surveiller l'air et les précipitations dans les zones éloignées de sources de pollution et de modéliser le transport atmosphérique et le dépôt des polluants. Pour évaluer les dépôts azotés, plusieurs possibilités existent dont les mesures par des stations installées sur le terrain et les modèles développés par des méthodes géostatistiques (Simpson *et al.*, 2011).

Ulrich & Williot (1993) qualifient le territoire français de « Terre inconnue » en raison du faible nombre de points de mesures pris en compte dans les cartes européennes de dépôts. En France, la surveillance de la qualité de l'air, gaz et particules, a débuté dans les années 70, concernant principalement SO_2 , NO_x et O_3 dans les zones urbaines et industrialisées. En revanche, l'importance des précipitations n'a été prise en compte qu'à partir des années 80. Le dispositif MERA (MEsure des Retombées Atmosphériques) constitue la contribution française, au réseau européen EMEP, du suivi des pollutions atmosphériques longue distance et transfrontières. Alors que le réseau EMEP regroupe actuellement plus de 300 stations réparties en Europe, le dispositif MERA ne comprend qu'une dizaine de stations en France complété par le sous-réseau CATAENAT, du réseau RENECOFOR, qui s'intéresse uniquement aux dépôts d'azote sur les écosystèmes forestiers. Ce dispositif n'offre donc pas une vision complète des dépôts azotés à l'échelle française, même s'il permet d'obtenir des mesures réelles de dépôts. En revanche, les modèles géostatistiques permettent de visualiser

les dépôts de N à l'échelle régionale comme mondiale. Le modèle EMEP, développé par le programme EMEP, a été conçu pour calculer les concentrations aériennes et les dépôts de la plupart des polluants acidifiants et eutrophisants, des photo-oxydants et des particules en suspension (Simpson *et al.*, 2006) (Figure 1.7). Des modèles nationaux sont aussi développés dans bon nombre de pays européen tels que le modèle français CHIMERE qui est en cours de développement. Pour des raisons pratiques et d'homogénéité avec les partenaires européens du programme BEGIN, le modèle EMEP a été utilisé, dans cette étude, comme le meilleur compromis pour estimer les dépôts azotés à l'échelle de la France.

Toutefois, les modèles sont perfectibles et pour paramétrer correctement les dépôts, il est nécessaire de (i) compiler les bases de données des points de compensation stomatique de différents milieux, (ii) extraire les mécanismes de résistance d'absorption par la cuticule et (iii) synthétiser les profils de gestion d'application de fertilisants. De même, la décomposition de la litière est un problème émergent dont le rôle en tant que source de NH_3 est mal compris. Des incertitudes persistent donc sur les processus de dépôts, notamment des composés azotés organiques, dont les sources et les formes sont très mal connues, même si les premières études suggèrent qu'ils pourraient contribuer significativement aux dépôts humides et seraient aussi présents sous forme de gaz et de particules dans l'atmosphère (Cornell *et al.*, 2003).

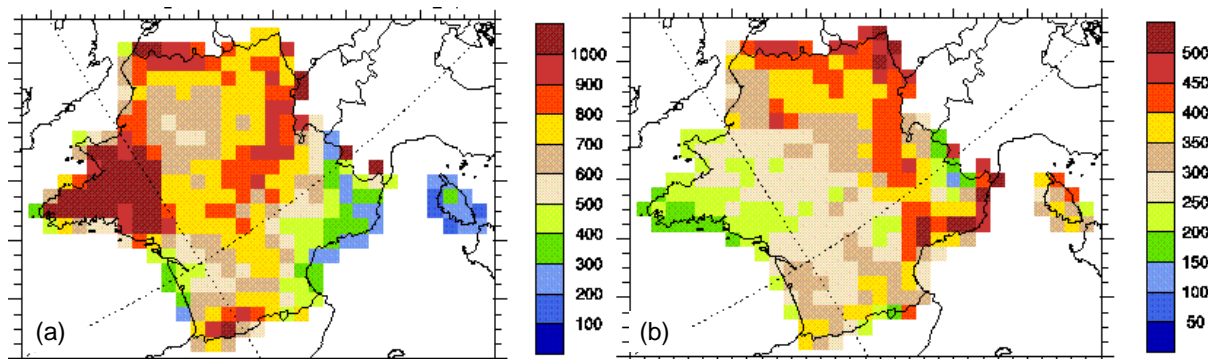


Figure 1.7. Dépôts totaux (mg N.m^{-2}) estimés en France sur l'année 2009 pour (a) l'azote réduit et (b) l'azote oxydé, par maille de 50 km x 50 km (données EMEP).

3. CONSEQUENCES DE L'ENRICHISSEMENT EN AZOTE DANS LES ECOSYSTEMES TERRESTRES

3.1. Cascade d'azot

La cascade de l'azote désigne le parcours d'un atome d'azote réactif à travers les différents compartiments de la biosphère, de l'hydrosphère, de la pédosphère et de l'atmosphère, jusqu'à son retour sous forme de diazote atmosphérique. Ce concept est utilisé pour démontrer les bénéfices d'une approche globale du cycle de l'azote, même s'il n'est

question ici que de l'impact des dépôts azotés sur les écosystèmes terrestres et particulièrement des prairies acides. Au cours de la fixation anthropique de N_2 en azote réactif, l'énergie est progressivement dissipée au fur et à mesure que l'azote est converti en différentes formes, jusqu'à ce qu'il soit éventuellement dénitrifié en N_2 , la forme azotée la plus stable dans la plupart des écosystèmes (Figure 1.8). Le concept de cascade d'azote souligne les liens de l'azote réactif à travers les différents compartiments des écosystèmes, mis en évidence lors de la description du cycle de l'azote. Les effets environnementaux de l'azote réactif apparaissent multiples et complexes et gérer le problème de la pollution azotée suppose donc de prendre en compte les compromis potentiels entre les différentes voies de la cascade d'azote. En effet, diminuer la perte d'azote dans une voie peut augmenter sa perte dans une autre voie, par exemple, des mesures de réduction de la lixiviation des nitrates peuvent augmenter les émissions d'ammonium dans l'atmosphère et inversement.

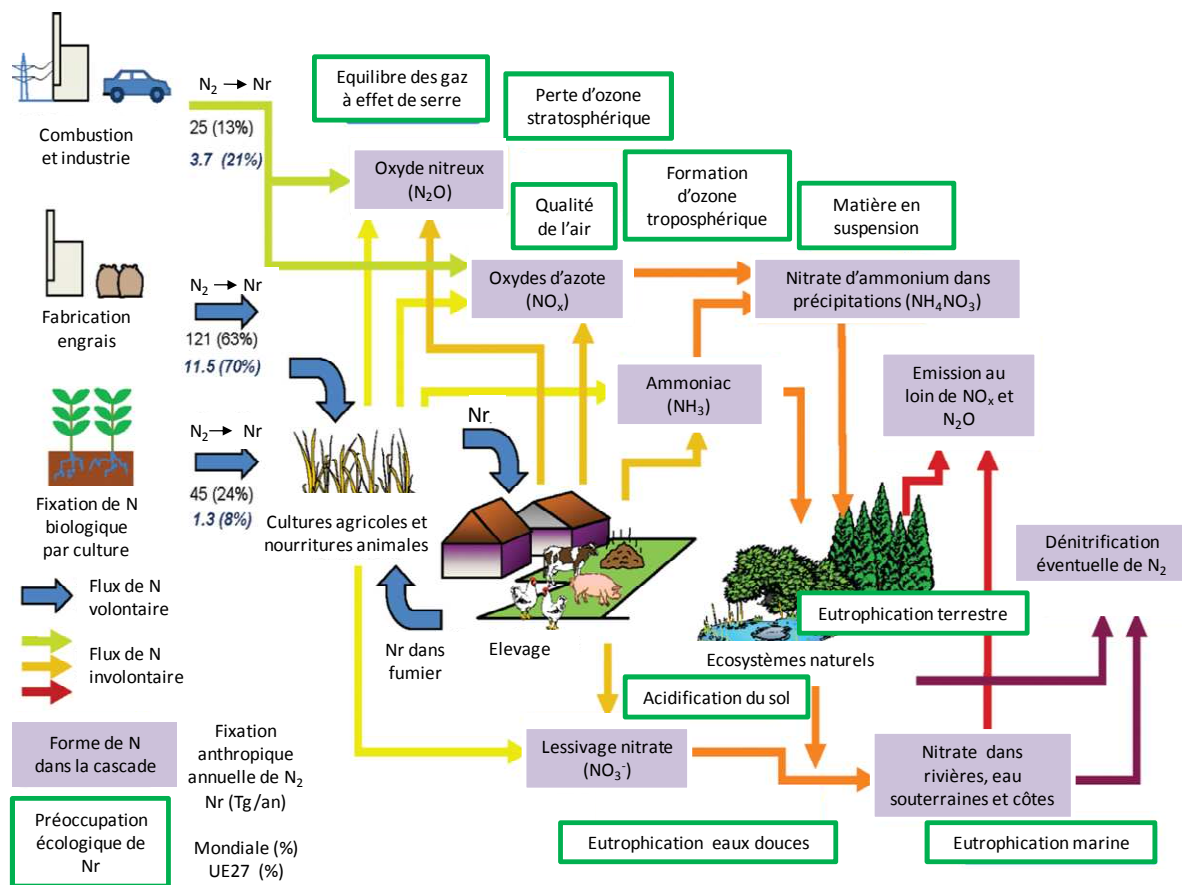


Figure 1.8. Schéma simplifié de la cascade d'azote soulignant les sources majeures d'azote réactif (Nr) à partir du diazote atmosphérique (N_2), les principales formes de polluants azotés (rectangles violets) et les principales conséquences environnementales (encadrés verts). Les flux volontaires anthropiques de Nr sont représentés par les flèches bleues et les flux involontaires par toutes les autres flèches (estimation de la fixation de N mondiale en Tg/an pour 2005 (en noir ; Galloway *et al.*, 2008) et européenne pour 2000 (en bleu ; Leip *et al.*, 2011)).

3.2. Description des processus

Une série d'événements directs et indirects se produit lors de l'augmentation des apports azotés, avec des conséquences à la fois biotiques et abiotiques (Figure 1.9). L'intensité de ces différents impacts sur les espèces et les communautés végétales dépend d'un certain nombre de facteurs dont (i) la durée et la quantité totale d'apports azotés, (ii) la forme chimique et physique des composés, (iii) la sensibilité propre des espèces végétales, (iv) les conditions locales telles que le climat, la capacité du sol à neutraliser les acides et la disponibilité d'autres nutriments et (v) la gestion actuelle et passée du système. En conséquence, les écosystèmes montrent une forte variabilité dans leur sensibilité aux dépôts azotés (Bobbink *et al.*, 2010). Ces principaux événements concernent l'acidification, qui implique des phénomènes de toxicité suite à l'accumulation de NH_4^+ et de métaux toxiques dans le sol, l'eutrophisation en considérant uniquement l'enrichissement en azote, la toxicité directe foliaire, la sensibilité aux facteurs de stress et de perturbation et la sensibilité selon la forme d'azote.

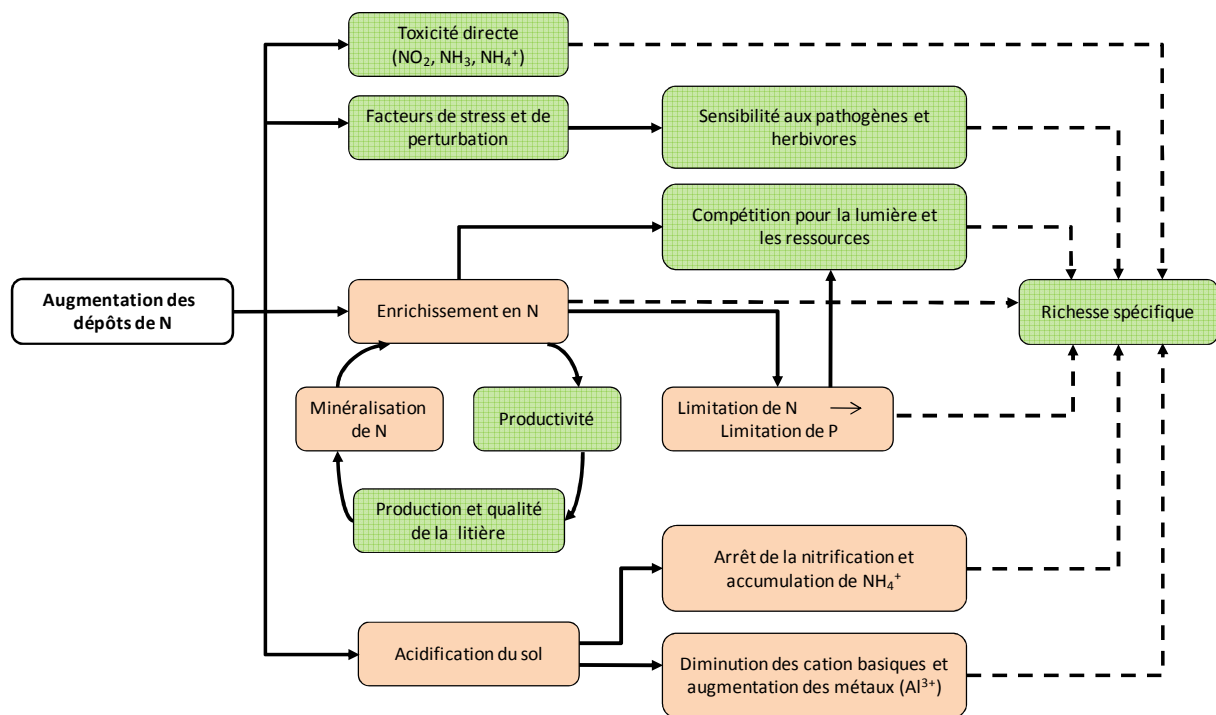


Figure 1.9. Impacts de l'augmentation des dépôts azotés sur les processus de l'écosystème et sur la richesse spécifique. Les conséquences abiotiques sont indiquées en orange et les conséquences biotiques en vert en considérant les augmentations par des flèches pleines et les diminutions par des flèches en pointillés (d'après Dise *et al.*, 2011).

Au niveau du sol, l'acidification, l'eutrophication en azote et les phénomènes qui en découlent, s'expliquent par les propriétés chimiques du sol. En effet, le sol est caractérisé par un pH qui correspond à l'activité des protons ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$), des cations échangeables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et Na^+), une capacité d'échange cationique (CEC), qui correspond au nombre de sites chimiques chargés négativement sur les particules du sol et qui mesure la capacité

tampon du sol, et un taux de saturation en base qui correspond au rapport entre les cations basiques et la CEC. Ainsi, la capacité du sol à neutraliser l'acidité (CNA) représente la différence entre l'ensemble des cations basiques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et Na^+) et l'ensemble des cations acides (Al^{3+}). De plus, ces ions incluent également des éléments nutritifs qui sont impliqués dans l'eutrophication du milieu (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , K^+) et dans des phénomènes de toxicité pour les plantes (NH_4^+ et ions métalliques (Al^{3+})).

3.2.1. Acidification du sol et conséquences

L'acidification d'un sol se produit lorsque des apports naturels ou anthropiques de protons (H^+) se substituent aux cations basiques adsorbés sur les particules de sol et présents dans les eaux interstitielles. L'acidification du sol peut être l'effet des formes d'azote à la fois oxydées et réduites. En effet, les formes oxydées agissent comme des anions mobiles entraînant les cations basiques, dont la teneur dans le sol diminue s'ils sont lixiviés sans être remplacés par des apports atmosphériques ou par l'altération du sol (Johnson & Cole, 1980). De même, les formes réduites produisent des effets acidifiants à travers la nitrification et les échanges racinaires de NH_4^+ en H^+ (Bolan *et al.*, 1991) (Figure 1.10). Cette acidification du sol, correspondant à une perte de CNA provoque des changements à long terme (Ulrich, 1983). Grâce à leur importante capacité tampon, les sols calcaires basiques ne subissent pas dans un premier temps, de modifications de leur pH lorsqu'ils sont exposés à des dépôts acides azotés et/ou soufrés puisque le pH se maintient généralement au-delà de 6,5 tant que les calciums de carbonate sont échangés. En revanche, dans les sols siliceux acides (pH 4,5-6,5), l'effet tampon, ayant lieu par des processus d'échanges de cations sur les surfaces d'adsorption du sol, est bien moindre. Dans un sol très minéral, avec une importante CEC et saturation en base, l'effet tampon peut se maintenir pendant plusieurs décennies malgré de forts dépôts acides mais, à terme, les cations basiques échangeables peuvent s'amenuiser provoquant une baisse du pH du sol ($\text{pH} < 5$) et la dissolution d'hydroxydes métalliques causant leur solubilisation spécialement de l'aluminium réactif (Al^{3+}). La forte acidité du sol réduit également le taux de décomposition de la matière organique, provoquant une accumulation de l'humus (van Breemen *et al.*, 1982 ; Ulrich, 1983). En conséquence, ces modifications peuvent affecter la croissance des plantes et la composition spécifique de la végétation dont les espèces les plus résistantes aux conditions acides peuvent dominer alors que les espèces typiques avec un pH de sol intermédiaire sont menacées.

L'acidification implique également des phénomènes de toxicité suite à l'accumulation de NH_4^+ et de métaux toxiques tels que l'aluminium dans le sol. En effet, lors de la baisse de pH, la capacité de l'écosystème à éliminer les composés azotés est compromise par une nitrification et des taux de prélèvement par les plantes faibles, ce qui entraîne une accumulation de NH_4^+ (Lucassen *et al.*, 2002). Au sein des plantes, la toxicité de l'azote réduit se produit si le prélèvement excède la capacité d'assimilation en causant des dysfonctionnements de structure et de transport membranaire (Krupa *et al.*, 2003). Mais

l'acidification du sol entraîne également la lixiviation de cation (K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}) qui provoque des déséquilibres nutritionnels pour la croissance des plantes et une libération d'éléments toxiques. Une fois solubilisés, les métaux lourds (Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), précédemment liés aux particules du sol, deviennent rapidement toxiques si leur concentration est importante. L'aluminium, troisième élément d'abondance dans la croûte terrestre, est naturellement le métal dont la teneur dans les sols est la plus élevée. Sa forte concentration dans le sol et son affinité pour les particules argileuses explique sa présence sur les sites d'adsorption du sol en cas de lixiviation des cations basiques. En conséquence, de fortes concentrations en aluminium dans la solution du sol induisent une nécrose et une inhibition de la croissance des racines, reliées à un jaunissement des feuilles ainsi que des problèmes de germination (Roem et al., 2002). Cette toxicité est fonction de la présence d'éléments (Ca^{2+} et Mg^{2+}), absorbés au niveau racinaire par les mêmes mécanismes que l'aluminium, car la compétition sur les sites d'absorption racinaires entre l'aluminium et ces cations basiques explique qu'un excès d'aluminium empêche l'assimilation des éléments nutritifs. Inversement, la toxicité de l'aluminium est diminuée si les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} augmentent. Afin de connaître les conditions favorables à la croissance des plantes, le paramètre le plus utilisé est le rapport entre les concentrations en aluminium et les concentrations en cations basiques dans les solutions du sol (Sverdrup & Warfinge, 1993). Toutefois, cet indice est contesté car il ne prend pas en compte la spéciation de l'aluminium alors que seules quelques formes d'aluminium seraient toxiques (Augusto & Ranger, 2001 ; de Wit *et al.*, 2001).

En résumé, certaines transformations de composés azotés représentent une source importante de protons, provoquant une acidification du sol, qui diminue considérablement la fertilité du sol et affecte les transformations microbiennes du sol (Bolan *et al.*, 2003). Il en résulte (i) une moindre grande disponibilité des nutriments tels que le phosphore, le calcium et le magnésium, (ii) une accumulation de composés toxiques tels que l'ammonium et l'aluminium et (iii) une limitation des activités microbiennes du sol impliquées dans les transformations de l'azote, telles que la minéralisation de composés organiques ou la fixation biologique. Un faible pH du sol favorise également la production de N_2O lors de la nitrification et de la dénitrification du sol (Beauchamp, 1997).

3.2.2. Eutrophisation et disponibilité en azote

Le phénomène d'eutrophisation, décrit en premier lieu pour les écosystèmes aquatiques, a été étendu aux écosystèmes terrestres. Dans les milieux terrestres, comme aquatiques, l'eutrophisation est déclenchée par des apports excédentaires de nutriments qui s'accumulent dans l'écosystème. Ces nutriments, principalement l'azote, le phosphore et le potassium, accroissent la productivité du milieu et perturbent les cycles biogéochimiques naturels, en modifiant le flux des éléments lors de la dégradation de la matière végétale. La modification des cycles de nutriments se traduit par des déséquilibres dans les concentrations des différents nutriments du milieu, ce qui provoque des changements de structure des

communautés. L'eutrophisation en général est donc causée par de multiples nutriments dont l'enrichissement en nutriment azotés.

A court terme, l'augmentation des dépôts azotés cause une augmentation de la disponibilité de la quantité de composés azotés inorganique dans le sol et modifie leur acquisition par les plantes (Nasholm, 1998). Par conséquent, une augmentation visible de la biomasse des plantes, limitées par l'azote, se produit à la fois par une augmentation de croissance des espèces présentes et par l'arrivée de nouvelles espèces plus productives. Ainsi, la production de litière et le taux de minéralisation d'azote peuvent augmenter, provoquant en retour une augmentation de la productivité des plantes (Figure 1.9). Ce mécanisme rétroactif favoriserait également le prélèvement par les plantes, du fait de la forte minéralisation de l'azote. Le rythme du cycle de l'azote serait alors accéléré par la hausse des apports azotés, avec une réponse rapide dans les écosystèmes dont les sols possèdent une faible réserve en azote. Au-delà d'un certain niveau de productivité, la diversité des espèces locales déclinerait du fait de la présence de nouvelles espèces capables d'exploiter les ressources azotées (Stevens *et al.*, 2006). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de la compétition entre les espèces : les espèces nitrophiles à croissance rapide, dont la biomasse augmente rapidement, étant en mesure d'intercepter la lumière (Wedin & Tilman, 1993 ; Hautier *et al.*, 2009) et d'exclure ainsi les espèces caractéristiques d'habitats oligotrophes ou mésotrophes, spécialement à risques (Bobbink *et al.*, 1998 ; Suding *et al.*, 2005). Ces changements de richesse et de composition spécifique pourraient aussi bien se produire avec de fortes doses d'azote ($100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) sur quelques années (Bobbink, 1991) qu'avec de faibles apports d'azote ($10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) sur plusieurs décennies (Clark & Tilman, 2008).

Lorsque l'azote n'est plus le nutriment limitant, la croissance des plantes devient alors limitée par d'autres ressources telles que l'eau ou le phosphore (P). Dans cette situation, la productivité des plantes n'augmenterait plus malgré une augmentation en composés azotés. Même si l'écosystème est limité par d'autres nutriments, les apports azotés à long-terme pourraient conduire à un déséquilibre de nutriments, notamment des anomalies dans le ratio N:P, qui pourrait ultérieurement changer la composition spécifique des plantes. Cependant, l'effet eutrophisant concerne également les apports phosphorés à travers la fertilisation, l'écoulement de l'eau dans les terres agricoles et les inondations par les eaux de surface polluées. L'enrichissement du milieu en composés phosphorés pourrait être un facteur déterminant dans la perte d'espèces prairiales, du fait de sa persistance dans le sol (Ceulemans *et al.*, 2011) et notamment des espèces associées aux mycorhizes pourraient être à risque puisque les mycorhizes assurent une meilleure disponibilité du phosphore dans le sol (Meyer *et al.*, 2010) même si la mycorhization tend à diminuer avec la fertilité du sol (van der Heijden *et al.*, 2008).

3.2.3. Toxicité directe foliaire

A de fortes concentrations, les gaz, les aérosols et les composés dissous azotés, notamment NO, NO₂, NH₃ et NH₄⁺, peuvent être extrêmement toxiques pour les parties aériennes des végétaux. Ces dommages directs sont dus à de fortes concentrations azotées à court-terme, plutôt qu'à des changements à grande échelle dans les écosystèmes, tels que l'eutrophication et l'acidification qui se produisent par l'accumulation sur le long terme de charges azotées dans le sol. Les cultures, les jeunes arbres mais également les espèces herbacées et arbustives montrent des dommages foliaires, des changements physiologiques et des réductions de croissance lors de fortes concentrations dans l'air ambiant de polluants azotés (Pearson & Stewart, 1993 ; Krupa, 2003). Les espèces végétales de prairies acides ont montré des phénomènes de toxicité lors d'exposition pendant 8 mois à des valeurs de 0,05 mg.m⁻³ de NH₃ (Krupa, 2003). Cependant, les lichens représentent les espèces végétales les plus sensibles à la toxicité directe par les dépôts secs azotés, surtout sous forme de NH₃ (Hallingback, 1992 ; van Herk *et al.*, 2003) même si les effets toxiques directs des dépôts humides sous forme de NH₄⁺, sont également visibles sur les lichens et les mousses à de relativement bas niveaux de dépôts d'azote (Bates, 2002). Les impacts directs ont été principalement observés ou déduits au milieu des années 80, concernant surtout des forêts fortement polluées (Nihlgård, 1985), mais ils sont devenus moins fréquents du fait de la fermeture et de la modernisation des industries émettant les composés azotés et de la réussite de la politique de contrôle de cette pollution. Cependant, ce phénomène n'est pour autant pas résolu puisque les concentrations en polluants azotés augmentent dans plusieurs régions d'Asie, notamment en Chine et en Inde, où les effets foliaires directs sont également prévisibles (Galloway *et al.*, 2008).

3.2.4. Prédilection aux facteurs de stress et de perturbation

La sensibilité des plantes aux facteurs de stress ou de perturbation peut être significativement affectée par les dépôts azotés. Les contraintes écologiques externes, telles que le manque de ressources ou le froid, sont capables d'engendrer un stress visible par une limitation de la vitesse de production de matière sèche de la végétation. Les changements liés aux composés azotés dans la physiologie, l'allocation de biomasse (rapport tige/racine) et le développement de mycorhizes peuvent avoir une influence sur la sensibilité des plantes à la sécheresse ou au froid, menant à une limitation de biomasse de certaines espèces avec des changements potentiels d'interactions biotiques.

La perturbation correspond aux mécanismes, discrets dans le temps et l'espace, qui diminuent la biomasse végétale en causant sa destruction partielle ou totale, tels que les inondations ou l'herbivorie (Grime, 1977). En général, l'herbivorie est affectée par le degré d'appétence des végétaux, qui est d'abord déterminé par le contenu en composés azotés (Throop & Lerda, 2004). Suite à l'augmentation des dépôts azotés, la prédilection des

plantes aux attaques de pathogènes augmenterait. Malgré des études sur ces niveaux de pathogènes, leur influence sur la diversité végétale est toujours incertaine dans la plupart des écosystèmes (Bobbink *et al.*, 2003 ; Flückiger *et al.*, 2002). Même si les données reliant l'intensité d'herbivorie aux dépôts azotés restent insuffisantes, les milieux de landes à callunes (*Calluna vulgaris*), ont montré la présence de coléoptères spécifiques (*Lochmaea suturalis*) qui attaquent les feuilles de callunes. L'ouverture de la canopée augmenterait le taux d'interception de lumière au sol et ainsi la croissance de Poacées en sous-étage, telles *Deschampsia flexuosa* ou *Molinia caerulea*. La fréquence et l'intensité de ces attaques sont reliées aux dépôts d'azote et aux concentrations azotées de la callune, bien que les processus exacts mis en jeu ne soient pas éclaircis (Brunsting & Heil, 1985 ; Bobbink & Lamers, 2002). Ces processus feraient intervenir à la fois des faibles concentrations de composés phénoliques, rendant les plantes moins résistantes, des concentrations plus fortes de composés azotés solubles, comme les acides aminés libres, augmentant l'appétence des plantes, et une vigueur plus faible des espèces exposées à la pollution azotée (Flückiger *et al.*, 2002).

3.2.5. Sensibilité à la forme de l'azote

La composition spécifique végétale peut être affectée par un changement de la forme dominante d'azote dans l'écosystème, favorisant les espèces végétales préférentiellement capables d'assimiler la forme azotée en question. Etant donné que les mesures de contrôle de pollution en Europe se sont d'avantage portées sur la réduction des émissions en NO_y plutôt qu'en NH_x , les régions sont principalement soumises à de forts dépôts azotés sous forme de NH_x , dus aux activités agricoles (Asman *et al.*, 1998 ; Fowler, 2005 ; Sutton *et al.*, 2008). Cette importante disponibilité en NH_4^+ induit des changements surtout visibles dans les sols dont les taux de nitrification sont faibles. En effet, les espèces de sols calcaires, ou faiblement acides, sont capables d'utiliser NO_3^- , ou une combinaison de NO_3^- et de NH_4^+ , comme source azotée. Au contraire, les espèces de sols siliceux acides ont une capacité limitée à utiliser NO_3^- du fait d'une activité réduite de la nitrate réductase chez la plupart de ces espèces au cours de l'évolution (Havill, 1974). Ainsi, la forte disponibilité de NH_4^+ dans les milieux acides a induit une utilisation plus importante de NH_4^+ par rapport à NO_3^- par les plantes de ces milieux (Gigon & Rorison, 1972). Les concentrations élevées de NH_4^+ dans le sol provoqueraient ainsi plus de dégâts sur la biodiversité que des concentrations importantes de NO_3^- . De même, les espèces de sous-bois dans des forêts de décidus seraient favorisées lorsqu'elles peuvent prélever les formes NH_4^+ et NO_3^- plutôt que de ne prélever que NH_4^+ (Falkengren-Grerup, 1998 ; Olsson & Falkengren-Grerup, 2000). En effet, l'augmentation du prélèvement de NH_4^+ mène à une réduction du prélèvement des cations basiques (K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+}) et aux échanges de ces cations entre les plantes et la rhizosphère provoquant, à terme, des déséquilibres nutritionnels et donc un déclin de la croissance (Nihlgård, 1985 ; van Dijk *et al.*, 1990 ; Bobbink *et al.*, 2003). Dans les prairies et les landes, plusieurs espèces rares ou menacées sont intolérantes à de fortes concentrations d'azote réduit et à de forts ratios $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (de Graaf *et al.*, 1998 ; Paulissen *et al.*, 2004 ; Kleijn *et al.*, 2008 ; van den Berg *et*

al., 2008). Notamment, les espèces de prairies acides sont d'avantage confrontées à de fortes concentrations en NH_4^+ que les espèces de milieux neutres ou basiques car, dans ces milieux, les changements sont d'abord pilotés par le pH et les taux de nitrification. Les fortes concentrations de NH_4^+ dans la solution du sol ou sur la couche humide des surfaces foliaires seraient donc toxiques pour de nombreuses espèces sensibles, provoquant des désordres physiologiques cellulaires, une acidification cellulaire, une accumulation d'acides aminées riches en azote, un faible développement racinaire et une inhibition de la croissance des tiges (Nihlgård, 1985).

Les effets des dépôts azotés sur la végétation peuvent également être différents selon le type de dépôts considérés, secs ou humides. Les forts dépôts en gaz et aérosols peuvent causer directement des dommages foliaires, notamment les dépôts gazeux de NH_3 alors que l'effet des dépôts importants de particules de HNO_3 reste méconnu. En effet, pour des gammes de dépôts similaires, la forme gazeuse NH_3 aurait un effet plus important que la forme humide NH_4^+ , particulièrement sur les espèces de lichens et de mousses, en augmentant la disponibilité de N et en augmentant le pH des écorces d'arbres (Sheppard *et al.*, 2008).

Pour résumer, les formes oxydées ou réduites de dépôts azotés ont potentiellement des effets différents sur la végétation puisque les processus impliqués, la sensibilité et l'utilisation par les plantes de ces différentes formes d'azote sont différents. Cependant, l'illustration de ces multiples effets est limitée dans l'environnement et les conditions locales du sol ainsi que la composition des espèces pourraient jouer un rôle sur la nature de ces effets.

3.2.6. Interactions avec d'autres polluants et avec le climat

Les effets acidifiants, à la fois des composés soufrés et azotés, dans l'eau et le sol peuvent se dérouler selon les mêmes mécanismes et dissocier les effets de chaque polluant reste difficile dans une région soumise à de forts dépôts azotés et soufrés. Les observations d'espèces résistantes aux milieux acides et le déclin des espèces sensibles aux conditions acides pourraient donc être un effet cumulé de ces deux composés atmosphériques. En effet, les forts niveaux de dépôts soufrés tolérés dans le passé peuvent également prédisposer le système à une plus forte sensibilité des dépôts azotés. Depuis leur pollution maximale dans les années 80, les dépôts soufrés ont fortement diminué à travers toute l'Europe (Lee, 1998). Cependant, dans des écosystèmes fortement impactés, particulièrement en Europe centrale et de l'Est, les sols continuent de présenter des niveaux élevés d'acidité et de métaux lourds et de faibles concentrations en cations basiques, causés par une exposition prolongée ou de forts apports lors d'une pollution antérieure (Blaser *et al.*, 1999). En plus des effets directs d'acidification et de la toxicité des métaux sur la composition spécifique des plantes, des déséquilibres nutritionnels dus aux dépôts azotés croissants peuvent se produire précocement dans des sols recevant de faibles dépôts azotés mais ayant été préalablement appauvris en cations basiques.

L'effet des dépôts azotés en interaction avec les changements climatiques est très mal connu. Pourtant, l'augmentation de la température depuis le siècle, due aux émissions de gaz à effets de serre, joue un rôle important dans l'interaction du cycle de l'azote et du carbone (IPCC, 2007). Avec l'augmentation générale de la température, les sols sont également réchauffés et les vitesses des réactions qui s'y produisent sont augmentées (Campbell *et al.*, 2009). En conséquence, l'azote à disposition des végétaux est accru, ce qui favorise la croissance de la biomasse végétale, considérée comme un puits de carbone (Magnani *et al.*, 2007 ; de Vries *et al.*, 2009). Cette rétroaction pourrait donc limiter la quantité de gaz à effet de serre dans l'atmosphère et donc la hausse des températures. Mais en parallèle, la matière organique du sol est également plus rapidement dégradée, contribuant ainsi à augmenter les émissions de CO₂ et de N₂O, suite à la dénitrification (Turner & Henry, 2009). A moins que la production nette de biomasse ne compense ces émissions, les sols pourraient donc se comporter comme une source de gaz à effets de serre. De plus, la température et les précipitations sont les principaux gradients responsables de la répartition des espèces végétales et animales (Gaston, 2000) donc si le climat change, la composition spécifique de l'écosystème change également (Sala *et al.*, 2000). En plus de ce changement de température, des modifications d'intensité et de fréquence des précipitations, de la sécheresse, du gel et des feux pourraient probablement interagir avec les dépôts azotés en affectant la biodiversité (Britton *et al.*, 2001 ; Gerdol *et al.*, 2007). Cependant, la plupart de ces facteurs liés au climat sont aussi les facteurs les plus incertains dans les modèles climatiques. Pour explorer les implications potentielles des dépôts azotés et du changement climatique sur la diversité végétale, seules l'approche expérimentale et l'utilisation de modèles déterministes ou empiriques sont utilisées, même si les modèles nécessitent d'être améliorés au fur et à mesure des nouvelles connaissances acquises dans les processus et de l'accumulation de nouvelles données.

3.3. Changements dans les prairies acides

Les prairies acides représentent des milieux caractérisés par des sols acides pauvres en bases, donc faiblement tamponnés, ce qui entraîne une baisse de pH lors de dépôts azotés ainsi qu'une accumulation de NH₄⁺ par un blocage de la nitrification si le pH est inférieur à 4,5. Pour ces systèmes, les changements d'espèces et de perte de diversité sont probablement fortement associés à l'acidification provoquée par l'apport en azote ou le changement de forme d'azote dans le sol.

Les impacts des apports azotés ont été étudiés expérimentalement dans des prairies à *Agrostis capillaris* (Figure 1.10) et à *Festuca ovina* différant par leur fertilité initiale. Après trois ans, la biomasse aérienne totale, ainsi que la biomasse des graminoides, ont montré une augmentation suite à l'addition de 19 kg N ha⁻¹ an⁻¹ dans les prairies peu fertiles à *Festuca ovina* (dépôts ambiants de 13 kg N ha⁻¹ an⁻¹) alors qu'aucune modification n'a été remarquée lors de l'addition de 37 kg N ha⁻¹ an⁻¹ dans les prairies les plus fertiles à *Agrostis capillaris*

(dépôts ambiants de 15 kg N ha⁻¹ an⁻¹) (Berlin, 1998). Une importante expérimentation d'addition azotée (35-70-140 kg N ha⁻¹ an⁻¹) est également menée depuis 1990 aux Royaume-Uni dans une prairie acide recevant des dépôts azotés ambiants d'environ 25 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Morecroft *et al.*, 1994 ; Lee & Caporn, 1998 ; Carroll *et al.*, 2000, 2003; Phoenix *et al.*, 2003; Horswill *et al.*, 2008 ; Arróniz-Crespo *et al.*, 2008). Dès la deuxième année, un déclin significatif de mousses, particulièrement de *Rhytidiadelphus squarrosus*, a été mesuré dans tous les lots traités, dont les tissus collectés ont montré une concentration azotée croissante avec l'addition de N (Carroll *et al.*, 2000). Bien que les concentrations azotés dans les mousses, les activités de la nitrate réductase et les taux de minéralisation de l'azote dans le sol aient nettement augmenté avec l'apport azoté (35 kg N ha⁻¹ an⁻¹) pendant les trois premières années, aucun changement significatif du couvert, de la composition ou de la diversité des espèces végétales n'a été observé durant les quatre premières années (Morecroft *et al.*, 1994). En revanche, lors de la sixième année de traitement, le couvert végétal a tendu vers une diminution avec l'augmentation d'apports azotés puis, à partir de la neuvième année, la végétation a montré une domination des Poacées pour les lots fortement fertilisés (Carroll *et al.*, 2003). En 1995, une expérience supplémentaire de manipulation croisée d'apports azotés et phosphorés a été menée pour les traitements 35 et 140 kg N ha⁻¹ an⁻¹. Les résultats du traitement pour l'apport azoté ont corroboré les précédents résultats, avec une diminution nette du couvert de *Festuca ovina*, *Luzula campestris* et *Potentilla erecta* et une augmentation de *Nardus stricta*. Au niveau du sol, cette expérience a également montré que le système était principalement limité par les composés phosphorés plutôt qu'azotés. Cependant, les lots n'ont pas présenté d'accumulation de composés azotés et leur lixiviation était uniquement significative dans le cas d'addition à 35 kg N ha⁻¹ an⁻¹, mais dans une faible proportion compte tenu des apports. La minéralisation de composés phosphorés organiques, mesurée par l'activité de la phosphomonoestérase dans le sol, a montré une augmentation au plus faible niveau d'apport azoté (35 kg N ha⁻¹ an⁻¹), après 3-4 ans d'expérimentation. Donc, l'augmentation de la disponibilité en composés azotés affecte aussi la répartition des composés phosphorés dans des systèmes limités en phosphore mais cet effet n'est le résultat que de changements à long-terme dans le sol (Johnson *et al.*, 1999).

Des études d'observation ont également été menées particulièrement dans des prairies acides de pays fortement soumis aux dépôts d'azote. En effet, aux Pays-Bas, des espèces rares extrêmement sensibles à l'acidification et l'accumulation de NH₄⁺, telles qu'*Arnica montana*, *Antennaria dioica*, *Thymus vulgaris* et *Dactylorhiza maculata*, ont disparu au profit d'espèces de Poacées, hautes et denses, dominant la végétation (de Graaf *et al.*, 1998 ; Kleijn *et al.*, 2008 ; van den Berg *et al.*, 2008). Les prairies acides ont également fait l'objet d'échantillonnage de terrain montrant que la richesse spécifique de la végétation était corrélée aux dépôts azotés. L'échantillonnage au Royaume-Uni de 68 prairies soumises à des dépôts de 5 à 35 kg N ha⁻¹ an⁻¹ a ainsi montré que les dépôts totaux azotés étaient le facteur le plus explicatif de la variation de richesse spécifique observée. La relation entre ces deux variables montre que la richesse spécifique est maintenue en deçà de 5 à 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ avec une nette diminution au-delà de 15 à 20 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Stevens *et al.*, 2004). Ces résultats ont été

confirmés (Maskell *et al.*, 2010) et complétés par une analyse du changement de composition le long du gradient de dépôts d'azote démontrant que l'acidification du sol était probablement le facteur déterminant dans le déclin du nombre d'espèces (Stevens *et al.*, 2010a).

En résumé, dans les systèmes limités en azote, il existe une forte augmentation de Poacées dominant et entraînant une plus forte compétition et l'exclusion d'espèces de petites tailles, comme certaines dicotylédones sous forme rosette, dès 15 à 20 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Berlin *et al.*, 2000). Ce phénomène est probablement accru par l'amélioration de la qualité de la litière et les taux de minéralisation de l'azote dans le sol. En revanche, dans les systèmes limités par le phosphore, la réponse des espèces vasculaires est plus lente, mais l'effet négatif est net et rapide en ce qui concerne les mousses (Carroll *et al.*, 2003). Les bilans des composés azotés et phosphorés semblent également affectés notamment par une importante lixiviation des composés azotés (Carroll *et al.*, 2003; Phoenix *et al.*, 2003).



Figure 1.10. Photographie d'une prairie acide échantillonnée aux Royaume-Uni dans le cadre du programme européen BEGIN. Les espèces caractéristiques des prairies acides sont visibles comme *Agrostis capillaris* et *Danthonia decumbens* (Poacées) et *Polygala* spp., *Potentilla erecta* et *Viola caninae* (Dicotylédones) (Stevens *et al.*, 2010a).

3.4. Charges critiques

Le contrôle des émissions européennes azotées et soufrées repose sur une approche centrée sur les effets : le concept de charge critique (Spranger *et al.*, 2008). La charge critique est définie comme étant « une estimation quantitative de l'exposition à un ou plusieurs polluants en dessous de laquelle des effets nocifs significatifs sur des éléments sensibles spécifiés de l'environnement n'apparaissent pas dans l'état actuel des connaissances » (Nilsson & Grennfelt, 1988). Leur valeur a été conçue à partir de modèles biologiques, utilisés comme instrument de mesure, et de modélisation de l'impact des polluants sur l'environnement (Reinds *et al.*, 2008). Dans les écosystèmes, la charge de polluant se produit sur une période variable mais le concept de charge critique est basé sur l'hypothèse d'un apport constant sur une période infinie, dans un système en régime permanent (les processus ont une vitesse constante) et à l'équilibre (les pertes sont égales aux apports). Les charges critiques reposent sur des valeurs seuils évaluées pour chaque écosystème (Tableau 1.3). Pour connaître les dommages potentiels des dépôts acides ou eutrophisants sur un écosystème, il est nécessaire de comparer les charges réelles aux charges critiques. Ces charges réelles, équivalentes aux dépôts sur le milieu et évaluées à partir des émissions de polluants et de leur dispersion dans l'atmosphère, sont calculées à l'aide de modèles atmosphériques régionaux ou nationaux (EMEP). La différence entre les charges critiques et les charges réelles détermine l'excès potentiel pour un écosystème donné. Les excès potentiels peuvent alors être cartographiés pour déterminer les zones à risques et pour optimiser les politiques de réduction d'émission de polluants (Figure 1.11). Bien qu'il existe encore des écosystèmes semi-naturels où les charges critiques en composés azotés sont en excès, notamment les forêts d'Europe, les niveaux d'excès ont considérablement décliné sur l'ensemble des habitats durant les 30 dernières années (Figure 1.11).

Tableau 1.3. Indication de perte de biodiversité dans différents habitats selon leur charge critique en azote basée sur des données expérimentales (Bobbink *et al.*, 2010 ; Bobbink & Hettelingh, 2011)

Habitat	Gamme charges critiques (kg N ha ⁻¹ an ⁻¹)	Indication d'excès de charge critique
Prairies acides	10-15	Augmentation des graminoides et déclin des espèces typiques
Prairies calcaires	15-25	Augmentation de graminées, diminution de la biodiversité Augmentation de la minéralisation et du lessivage de N
Landes sèches et humides	10-20	Déclin de la callune au profit de graminées, diminution des lichens
Pelouses alpines acides ou calcaires	5-10	Diminution des lichens, mousses et d'arbustes sempervirents
Forêts tempérées	10-15	Changement de la composition spécifique, augmentation des espèces nitrophiles, augmentation de la sensibilité aux parasites, changement des espèces de mycorhizes

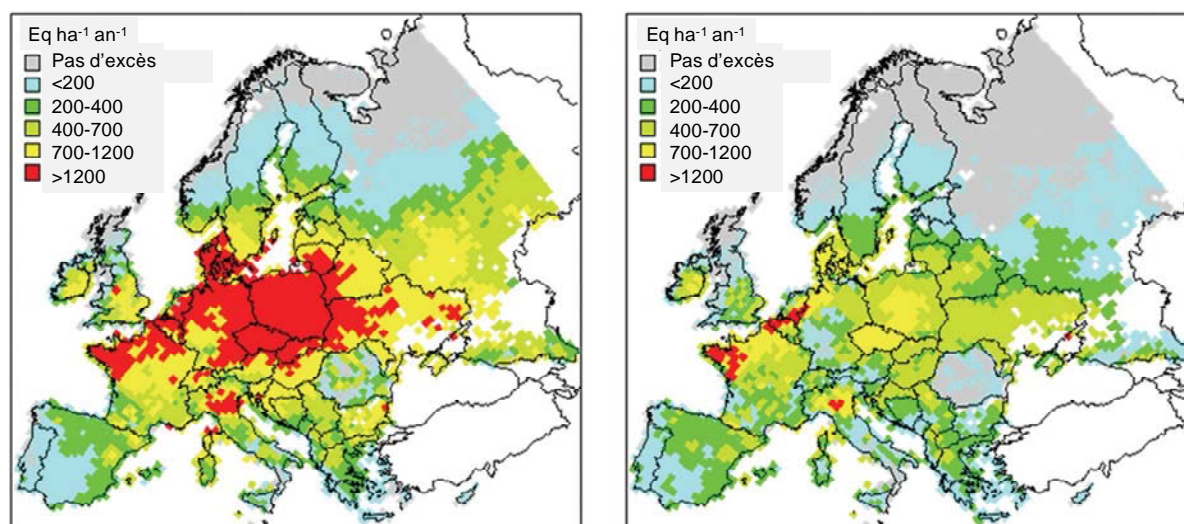


Figure 1.11. Excès des charges critiques d'eutrophication en azote par les dépôts en 1980 (à gauche) et projetés pour 2010 (à droite) sous la législation en cours. Les cartes ont été réalisées à l'aide des données officielles de charges critiques d'azote pour chaque pays (carte 1980 d'une communication personnelle de M. Posh et carte 2010 de Hettelingh *et al.*, 2008).

L'évaluation de la justesse des charges critiques en composés azotés pour la biodiversité en est encore au début et s'est surtout focalisée sur l'utilisation de charges critiques empiriques pour l'eutrophication. Ces dernières sont basées sur des mesures et des observations de terrain afin d'identifier les valeurs limites des effets de dépôts azotés sur les fonctions ou les structures des écosystèmes (Bobbink *et al.*, 2003). Le tableau 1.3 résume les indices montrant que la biodiversité des habitats sensibles européens est affectée lorsque la charge critique en nutriment est dépassée. Les habitats, tels que les systèmes dunaires ou méditerranéens, n'ont pas été pris en compte en raison de charges critiques ou d'indices inexistantes ou trop incertains. La gamme de charges critiques donnée pour les prairies acides ($10-15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) est basée sur les études précédemment citées, menées dans les pays fortement impactés par les dépôts azotés. Cette gamme semble fiable mais elle rend compte du besoin de multiplier les études dans différents pays, notamment dans des pays recevant peu de dépôts azotés.

Cependant, plusieurs raisons poussent à prendre avec prudence le seul excès de charge critique pour évaluer les risques sur la biodiversité. Premièrement, les jeux de données de surveillance environnementale ne sont généralement pas conçus pour identifier les impacts des dépôts azotés et donc attribuer les impacts à ces dépôts peut être difficile. Deuxièmement, les expériences d'apports azotés à relativement court terme, utilisées pour définir les charges critiques, ne reflètent pas précisément l'impact de plusieurs décennies de dépôts azotés au sein des écosystèmes sensibles. Troisièmement, il est difficile de prévoir quand et à quel niveau, la biodiversité d'un système peut être rétablie si le niveau de pollution est égal ou inférieur au niveau de charge critique du fait de facteurs tels que l'accumulation de composés azotés dans le système, les changements climatiques et les limitations dans le recrutement des espèces typiques. Quatrièmement, des habitats différents au sein d'un même type

d'écosystème sont différemment vulnérables aux dépôts azotés. Par exemple, les prairies acides sont plus vulnérables que les prairies calcaires ce qui est visible par leur charge critique plus faible (Tableau 1.3). L'extrapolation régionale, basée sur des charges critiques données pour de larges types de systèmes, peut sous-estimer l'impact des dépôts azotés au niveau d'habitats localisés plus vulnérables. Enfin, la gamme de charge critique du tableau 1.3 décrit uniquement les impacts des dépôts azotés mais ne prend pas en compte le type de dépôt. Comme discuté précédemment, les dépôts gazeux de NH_3 peuvent autant réduire la diversité que des gammes équivalentes de dépôts humides azotés, surtout pour les espèces non vasculaires. Le niveau critique pour les dépôts de NH_3 , correspondant à une concentration et non à une charge, a récemment été évalué à $1 \mu\text{g m}^{-3}$ dans des communautés dominées par des lichens et des mousses et $3 \mu\text{g m}^{-3}$ dans des communautés dominées par des espèces vasculaires (Cape *et al.*, 2009). A l'avenir, l'évaluation des excès de ces niveaux, tout comme les charges critiques, devrait être prise en compte pour étudier l'impact des dépôts azotés sur la biodiversité.



A la recherche de la potentille dans les prairies acides du magnifique Pays Basque - couverture du Global Change Biology, 2011, 17.

CHAPITRE 2

EMPREINTE DES DEPOTS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE SUR LES PRAIRIES ACIDES DU DOMAINE ATLANTIQUE

A la recherche de la potentielle...

Article 1 **Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe**

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise

Environmental Pollution (2010) 158, 2940-2945, doi 10.1016/j.envpol.2010.06.006

Article 2 **Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition**

Carly Stevens, Cecilia Duprè, Cassandre Gaudnik, Edu Dorland, Nancy Dise, David Gowing, Albert Bleeker, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Vigdis Vandvik, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Per Arild Aarrestad, Serge Muller & Martin Diekmann

Journal of Vegetation Science (2011) 22, 207–215, doi : 10.1111/j.1654-1103.2010.01254.x

Article 3 **The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe**

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise

Environmental Pollution (2011) 159, 2243-2250, doi : 10.1016/j.envpol.2010.11.026

Article 4 **Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change**

Cassandre Gaudnik, Emmanuel Corcket, Bernard Clément, Chloé E.L. Delmas, Sandrine Gombert-Courvoisier, Serge Muller, Carly J. Stevens and Didier Alard

Global Change Biology (2011) 17, 3351-3365, doi : 10.1111/j.1365-2486.2011.02463.x

Afin d'étudier les relations entre la végétation des prairies acides et les dépôts d'azote, des études ont été menées sur la large échelle du domaine atlantique européen, de la France à la Norvège, dans le cadre du programme BEGIN (Biodiversity of the European Grasslands-the Impacts of N deposition). Ces prairies acides du *Violion caninae*, classe européenne EUNIS E.1.7, ont fait l'objet d'études à la fois sur la richesse spécifique des espèces végétales (Stevens *et al.*, 2010 ; article 1, annexe 1), sur la composition spécifique de la végétation (Stevens *et al.*, 2011a ; article 2, annexe 2), ainsi que sur différents groupes fonctionnels de la végétation et sur la composition chimique du sol et des plantes (Stevens *et al.*, 2011b ; article 3, annexe 3). Parallèlement aux résultats obtenus à l'échelle européenne, l'empreinte des dépôts d'azote atmosphérique a été décrite à l'échelle plus fine du domaine atlantique français en intégrant les différents types de communautés végétales de ces prairies acides (Gaudnik *et al.*, 2011 ; article 4).

En Europe, l'échantillonnage des 153 prairies acides étudiées montre que les dépôts azotés provoquent une réduction de la richesse spécifique de ces prairies, non plus seulement à l'échelle nationale du Royaume-Uni (Stevens *et al.*, 2004), mais à une large échelle atlantique (Stevens *et al.*, 2010). Dans cette étude, la richesse spécifique est corrélée aux dépôts azotés dont la large gamme s'étend de 2 et 44 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Figure 2.4). Le nombre d'espèces végétales tend à suivre une relation curvilinéaire vis-à-vis de la gamme de dépôts (Emmett *et al.*, 2007), et non pas une relation linéaire (Stevens *et al.*, 2004), avec des réductions d'espèces plus importantes aux plus forts dépôts azotés.

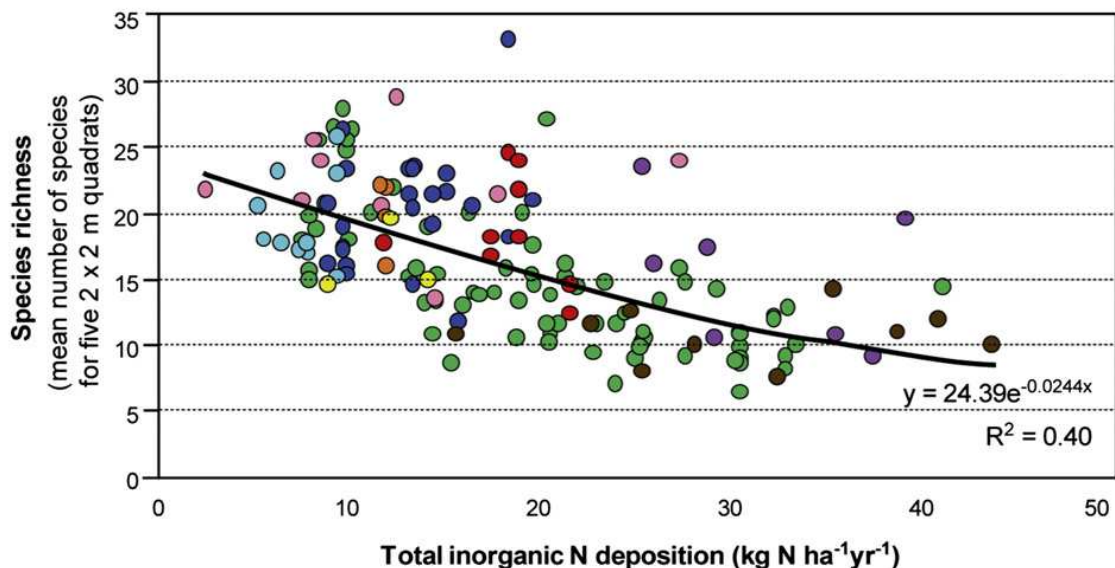


Figure 2.4. Richesse spécifique totale des espèces de plantes (nombre moyen d'espèces dans les 5 quadrats de 2 x 2 m de chaque site) en fonction des dépôts totaux inorganiques d'azote (N) pour chaque pays échantillonnés : Belgique (rouge), Danemark (jaune), France (bleu foncé), Grande Bretagne (vert), Allemagne (marron), Irlande, Irlande du nord et l'Ile de Man (rose), Pays-Bas (violet), Norvège (turquoise) et Suède (orange). La relation curvilinéaire entre les dépôts azotés et la richesse spécifique est indiquée avec l'équation et le coefficient de détermination (R^2) (Stevens *et al.*, 2010, article 1, annexe 1).

Cette relation indique que les richesses spécifiques les plus importantes correspondent aux prairies soumises à des dépôts entre 5 et 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹, avec un nombre d'espèces qui diminue dramatiquement, mais lentement, lorsque la végétation est soumise à des dépôts supérieurs à 20 kg N ha⁻¹ an⁻¹. La relation établie entre la richesse spécifique et les dépôts azotés s'articule donc autour d'une valeur de 20 kg N ha⁻¹ an⁻¹ : en deçà de cette valeur, la perte d'une espèce se produit pour de forts dépôts d'azote (3,5 kg N ha⁻¹ an⁻¹) alors qu'au-delà de cette valeur, la perte d'une espèce survient pour un taux de dépôts plus faible (2,3 kg N ha⁻¹ an⁻¹). La diminution de la richesse spécifique correspond principalement à la perte de dicotylédones, qui sont très peu présentes lorsque les dépôts azotés sont élevés (article 4). Cette étude confirme la réévaluation à la baisse de la gamme de charges critiques azotées, qui se situe actuellement entre 10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹ pour ce type de prairies acides (Bobbink & Hettelingh, 2011), alors que récemment les charges critiques étaient encore évaluées à 10-20 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Bobbink *et al.*, 2003). Dans le but de conserver ces prairies, il est nécessaire de protéger les espèces les plus sensibles situées dans des zones encore peu impactées par les dépôts azotés, là où le potentiel de perte d'espèces est le plus fort.

Au niveau du domaine atlantique européen, les prairies acides ont montré une sensibilité aux charges azotées par une diminution de la richesse spécifique au dépend des espèces de petites tailles, telles que les dicotylédones sous forme de rosette, suite à la domination et à la compétition des Poacées. Ces résultats de richesse spécifique s'expliquent peu par les variables géographiques tandis que les variables climatiques et géographiques expliquent près d'un tiers de la variation de la composition de végétation. Le changement de richesse spécifique, suite aux dépôts azotés, est nettement visible du fait de la perte d'espèces rares, alors que le changement de composition de la végétation n'est pas évident, étant donné que les espèces dominantes restent identiques (Stevens *et al.*, 2010). Toutefois, le nombre de dicotylédones tend à diminuer dès 15-20 kg N ha⁻¹ an⁻¹, et même au-delà, en concomitance avec une augmentation des Poacées (Stevens *et al.*, 2011a, b). En effet, les espèces négativement associées aux dépôts azotés incluent principalement des espèces de dicotylédones (*Campanula rotundifolia*, *Leontodon autumnalis*, *Viola riviniana*), connues pour être de faibles espèces compétitrices, avec une stratégie plutôt de stress-tolérante, et des espèces intolérantes à des sols fortement acides (Figure 2.5). Les espèces négativement associées aux dépôts azotés incluent également une espèce de Poacées (*Agrostis curtisii*), connue pour être typique des habitats non fertiles (Hill *et al.*, 1999), et une mousse (*Hylocomium splendens*), connue pour être sensible à l'acidification provoquée par les apports azotés (Rodenkirchen, 1992). En revanche, *Festuca ovina*, *Holcus mollis*, *Juncus effusus* et *Nardus stricta* représentent les graminéoïdes dominantes des prairies acides les plus soumises aux dépôts azotés, avec également des dicotylédones (*Leontodon hispidus* et *Cerastium fontanum*). Ces espèces ne sont pas typiques d'habitats fertiles, puisque la communauté échantillonnée se caractérise par des sols extrêmement oligotrophes, mais elles représentent des espèces généralistes dont certaines se comportent comme des espèces compétitrices.

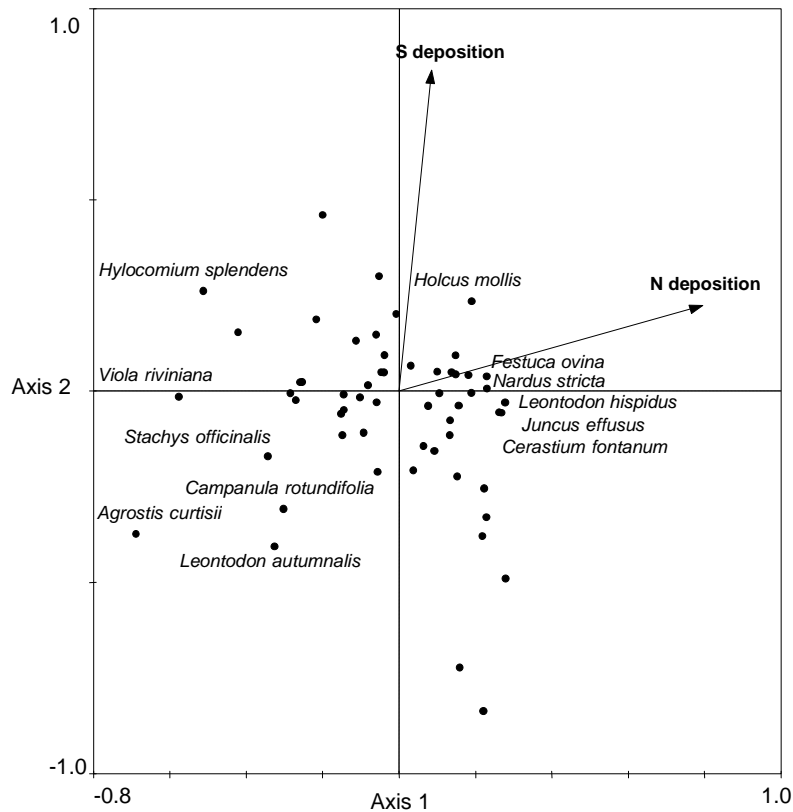


Figure 2.5. Diagramme d'ordination de la CCA (Canonical Correspondence Analyses) des axes 1 et 2 pour toutes les espèces avec les variables de dépôts de N et S utilisées comme variables environnementales et les variables de climat et de sol utilisées comme co-variables. Les espèces représentées sont présentes dans plus de 10% des sites (les espèces rares ont une faible contribution) et celles nommées sont associées positivement ou négativement aux dépôts de N, selon leur position dans le diagramme (Stevens *et al.*, 2010, article 2, annexe 2).

A l'échelle européenne atlantique, la variation de la composition spécifique des 153 prairies acides s'explique par des variables du climat, du sol et de dépôt. A cette échelle comme à l'échelle française, le patron de composition végétale des prairies s'explique d'avantage par les variables climatiques (30,8% de la variation expliquée) que par les dépôts azotés et soufrés (9,8% de la variation expliquée). Mais ce sont les variables édaphiques qui expliquent la plus grande part de variation de la composition spécifique (38,0%). Bien que l'empreinte des dépôts azotés et soufrés apparaisse secondairement par rapport aux gradients climatiques et biogéochimiques du sol, et dans une moindre mesure que pour la richesse spécifique, l'impact de ces dépôts sur les prairies acides est détecté par leur influence sur la composition spécifique végétale, à la fois directement et surtout indirectement par les effets sur le sol. En effet, il est difficile de séparer les effets biogéochimiques dû à la nature du sol ou dû aux dépôts d'azote, puisque ces dépôts influent sur un grand nombre de processus du sol à travers l'acidification. L'analyse du changement de richesse spécifique des prairies acides pointe les dépôts d'azote comme un facteur prédominant dans le déclin du nombre d'espèces végétales, principalement par ses effets sur le sol en l'acidifiant (Figure 2.6) et en augmentant la disponibilité en métaux toxiques comme l'aluminium (Stevens *et al.*, 2010).

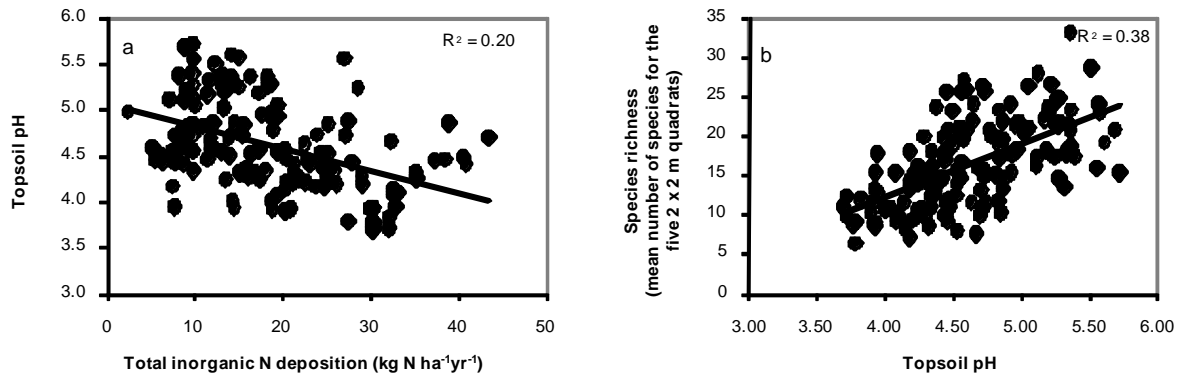


Figure 2.6. pH du sol de surface en fonction des dépôts totaux inorganiques de d'azote ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) et richesse spécifique totale des plantes (nombre moyen d'espèces dans les 5 quadrats de $2 \times 2 \text{ m}$ de chaque site) en fonction du pH du sol de surface pour les 153 prairies acides échantillonnées dans le large domaine atlantique européen (Stevens *et al.*, 2010, article 1, annexe 1).

Les changements de composition spécifique sont probablement accrus par des mécanismes rétroactifs suite à l'augmentation de l'abondance des Poacées, tels que l'amélioration de la litière qui entraîne une meilleure minéralisation de l'azote dans le sol. Ces changements de végétation des prairies acides du domaine atlantique européen sont liés à des modifications dans la chimie du sol, suite à l'augmentation des dépôts d'azote. Ces modifications chimiques sont visibles à travers l'augmentation du ratio C:N dans le sol avec l'amplification des dépôts d'azote (Figure 2.7a). Cette plus forte disponibilité en azote favorise l'assimilation carbonée, qui entraîne à son tour une meilleure minéralisation de l'azote dans le sol, et ainsi un plus fort potentiel de croissance des plantes. Ce mécanisme peut entraîner un effet rétroactif positif sur la qualité de la litière et la minéralisation de l'azote, mais qui n'est pas visible ici puisque le contenu en azote foliaire des plantes échantillonnées ne varie pas avec les dépôts d'azote.

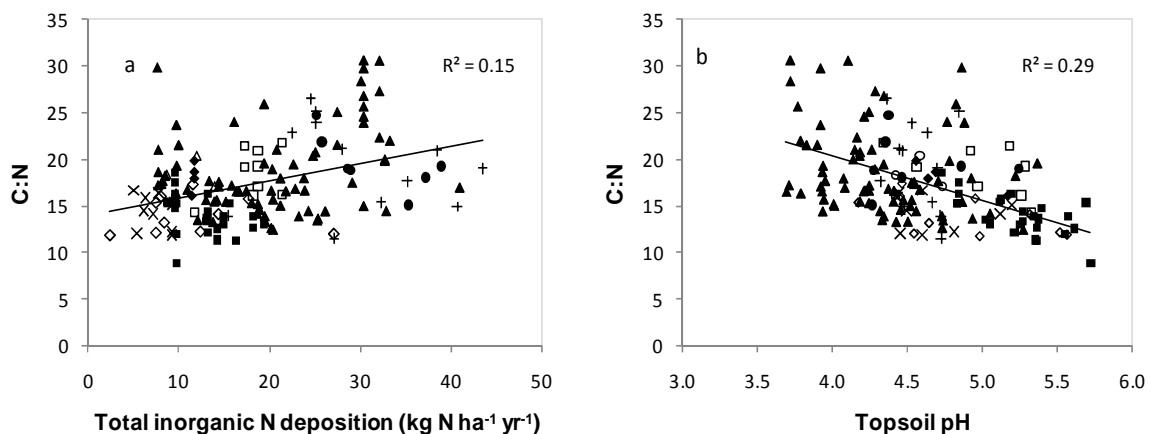


Figure 2.7. Ratio C:N du sol de surface en fonction a) des dépôts totaux de N inorganiques et b) du pH du sol de surface, pour les 153 prairies échantillonnées dans la région biogéographique atlantique d'Europe. Les symboles correspondent aux données collectées dans chaque pays : \square Belgique, \circ Danemark, \blacksquare France, $+$ Allemagne, \diamond Irlande et Ile de Man, \bullet Pays-Bas, \times Norvège, \blacklozenge Suède, et \blacktriangle Royaume-Uni (Stevens *et al.*, 2010, article 3, annexe 3).

En revanche, l'étude de la chimie du sol indique que le ratio C:N diminue avec l'augmentation du pH du sol de surface (Figure 2.7b). La disponibilité en azote est donc plus importante lorsque le sol n'est pas trop acide, puisque l'activité des micro-organismes est bloquée à un pH très acide. De plus, le changement de ratio C:N dans le sol ne s'accompagne pas de variation dans les concentrations du sol en nitrates et ammonium. En effet, il est possible que ces concentrations restent stables par l'effet positif de l'apport azoté, par les dépôts, et simultanément par l'effet négatif des processus acidifiants le sol, tels que la minéralisation de la matière organique, le prélèvement de l'ammonium disponible par les plantes et la nitrification.

En résumé, les études établies sur cette large échelle biogéographique atlantique ont mis en évidence l'importance des dépôts d'azote atmosphérique, comme composante du changement global, par son large impact sur la végétation. Toutefois, l'effet de ces dépôts ne semble visible à une large échelle géographique que lorsque le gradient considéré de dépôts d'azote est large, alors que si le gradient est réduit, seul l'empreinte locale des dépôts d'azote est visible (Gaudnik *et al.*, 2011). Ces études comparatives, réalisées à l'échelle spatiale, corroborent les études temporelles réalisées sur le même type d'habitat (Duprès *et al.*, 2010 ; Gaudnik *et al.*, 2011) et soutiennent l'utilité d'études spatiales, le long d'un gradient azoté, lorsque les données historiques ne sont pas disponibles. En prenant en compte ces études, la nouvelle gamme de charges critiques azotées pour les prairies acides (10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹) semble fiable mais il est clairement nécessaire d'obtenir d'avantage d'études de terrain dans différents pays, principalement des expérimentations de faibles apports azotés dans des sites recevant peu de dépôts ambiants d'azote atmosphérique. L'empreinte des dépôts d'azote sur la composition des espèces est plus diffuse que celle sur la richesse spécifique, qui est nettement détectable. Cependant, les variations de composition corroborent les résultats selon lesquels les espèces les plus sensibles aux dépôts azotés sont essentiellement des dicotylédones, qui ne supportent pas la compétition et sont intolérantes à la forte acidité du sol. Dans ces prairies acides, les processus mis en jeu dans la réduction des espèces ne semblent pas dus à la compétition pour la lumière, qui n'est pas aussi importante que dans d'autres communautés, puisque des espèces très sensibles à la lumière, comme les mousses, ne sont pas affectées le long du gradient azoté et tendent même à augmenter avec celui-ci. En revanche, les dépôts d'azote atmosphérique demeurent un facteur explicatif de la diminution de la richesse spécifique des prairies acides, principalement par l'acidification du sol. Il est nécessaire d'étudier plus avant les processus à l'interface sol-plante pour éclaircir les mécanismes mis en jeu dans le sol, suite à ces dépôts azotés.

Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change

Cassandre Gaudnik, Emmanuel Corcket, Bernard Clément, Chloé E.L. Delmas, Sandrine Gombert-Courvoisier, Serge Muller, Carly J. Stevens and Didier Alard

Global Change Biology (2011)

Abstract

Although atmospheric nitrogen (N) deposition and climate changes are both recognized as major components of global change, their interaction at ecosystem level is less well understood. A stratified resampling approach was used to investigate the potential impact of changing levels of atmospheric nitrogen deposition and climate change on species composition of nutrient-poor acid grasslands within the French Atlantic Domain (FAD). The study was based on a comparison, over a period of 25 years, of 162 past and present vegetation records assigned to the species-rich *Nardus* grasslands and distributed in regional community types (CTs). Similarly, the characterisation of N deposition and climate was stratified according to (1) past (1980-1990) and present (1995-2005) periods; (2) FAD and CT scales. Despite the relatively short time span between sampling periods, significant N deposition and climate changes were detected as well as vegetation changes. Correspondence analysis showed that the relative importance of N deposition and climate in explaining vegetation changes depended on the spatial scale of investigation (FAD vs. local CTs) and the CT. At the FAD scale, the increase of annual mean temperature and decrease of water availability were clearly related to changes in floristic composition. At the local scale, the most stable CT experienced no significant climate change and a stable load of N deposition whereas the CTs characterised by the largest floristic changes were associated with dramatic climate changes and moderate loads in both oxidized and reduced N deposition. Despite the narrow gradient of deposition investigated, N deposition was related to significant grassland community changes, depending on the region *i.e.* climate context and on whether N deposition was in the oxidized or reduced form. Our results suggest that N deposition drives grassland composition at the local scale, in interaction with climate, while climate changes remain the predominant driver at the FAD scale.

Keywords: climate change, French Atlantic Domain, oxidized and reduced nitrogen deposition, resampling, species composition, species-rich *Nardus* grasslands

Introduction

Climate change and atmospheric nitrogen (N) deposition represent two components of contemporary global change which are both considered as important, but unequal, challenges to biodiversity issues (Sala *et al.*, 2000; GBO-3, 2010). While scientists have mostly focused on climate change as the prime threat to biodiversity conservation (Hannah *et al.*, 2002), air pollution, an acknowledged widespread problem, is increasingly considered in nature planning or management (Lovett *et al.*, 2009) and nowadays recognized for its importance in conservation issues and ecosystem health (Sala *et al.*, 2000; Phoenix *et al.*, 2006; Bobbink *et al.*, 2010a). Historic climatic warming is now well documented (Moberg *et al.*, 2005; Osborn & Briffa, 2006) and it is projected that the increase of the global mean surface temperature will rise from 1.8 at present to 4.0°C over the next 100 years, mainly due to the CO₂ enrichment of the atmosphere by fossil fuel use (IPCC, 2007). Specific climate events, such as regional heatwaves, may also become more frequent and affect ecosystem properties and species physiology, distribution and phenology (Ciais *et al.*, 2005; Peñuelas *et al.*, 2007). However, the effects of climate change on ecosystems remain uncertain due to its spatial variability and the specificity of habitats responses. Similarly, the global N cycle is largely modified by human activities, from intensive agriculture and industrial activities, and has reached the point where more N is fixed annually by human-driven than by natural processes (Vitousek *et al.*, 1997; Galloway, 1998). The atmospheric deposition of reactive N has increased in Europe from an estimated background rate of 1-5 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ in the early 1900s to 30-60 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ in the 1980s and the early 1990s in the worst affected regions (NEG-TAP, 2001). Although, in most north-western European countries, emissions of oxidized N declined after the 1990s as a result of more stringent legislation (Fagerli & Aas, 2008), current deposition rates are still an order of magnitude higher than in preindustrial time (Galloway *et al.*, 2008). The continental anthropogenic N fixation rate is predicted to increase by about 60% by the year 2020 and expose more terrestrial ecosystems to greater rate of N deposition (Dentener *et al.*, 2006). Even though N deposition rates are in decline in some regions, the recovery of ecosystems from eutrophication can lag behind by decades because N has the potential to accumulate in ecosystems (Cunha *et al.*, 2002). As a consequence, the effects of increased atmospheric N deposition will remain a significant problem for many semi-natural habitats in the future and recovery may often not be possible without active management and restoration measures (Wamelink *et al.*, 2009).

Enhanced N levels represent a particular threat to temperate semi-natural or unimproved vegetation types since most temperate terrestrial systems are N limited (Vitousek & Howarth, 1991). Oligo- and mesotrophic ecosystems are especially at risk because many characteristic species are adapted to nutrient-poor conditions and are outcompeted by species with higher N demands (Wedin & Tilman, 1993; Hautier *et al.*, 2009). In Europe, impacts of N deposition have been mostly studied in countries experiencing high levels of N deposition. Research on N deposition impacts provides a range of indirect effects on plants by changing

soil chemistry through base cation depletion from soils and greater rates of nitrification. The resulting acidification, eutrophication, nitrate leaching and increased solubility of phytotoxic elements (Al, Fe) have been identified as the major effects of excessive N deposition on soil, especially those with low acid-buffering capacity and on the ecosystems they support (Carroll *et al.*, 2003; Pilkington *et al.*, 2005; Horswill *et al.*, 2008). Overall, indirect effects of total N deposition on plants have been identified as increasing plant and litter productivity (Tomassen *et al.*, 2003), reducing species richness (Stevens *et al.*, 2004, Stevens *et al.*, 2010) and increasing susceptibility of plants to stress and disturbance including pathogens, herbivory (Throop *et al.*, 2004), drought, and frost (Caporn *et al.*, 2000; Sheppard & Leith, 2002). Direct toxicity of ammonia was also observed on plant foliage through physiological perturbation following assimilation by leaves (Pearson & Stewart, 1993).

In Europe, there are various semi-natural ecosystem types that are susceptible to N deposition impacts for which empirical critical loads have been derived (Bobbink & Hettelingh, 2011). Among these ecosystems, *Agrostis sp.* dominated grasslands are found throughout France and parts of Europe where they occupy various nutrient-poor sites. These grasslands are characterised by acid soils with low capacities to buffer against N enrichment making them particularly vulnerable to the induced acidification. In France, they cover a wide geographic and climatic range from the west coast, characterized by an oceanic humid climate with mild winters and warm summers, to the east border characterized by a relatively dry continental climate with hot summers and cold dry winters. In Europe, these grasslands of high conservation value have declined in recent years (Haines-Young *et al.*, 2003) and they are now considered as habitats of priority interest for the Natura 2000 network under the Habitats Directive (Flora directive 92/43/EEC). These grasslands are representative of the 'species-rich *Nardus* grasslands' (Natura 2000 code 6230) (Bensettiti *et al.*, 2005). In addition to land use change, habitat loss has resulted from abandonment of traditional management practices followed by successional changes to other vegetation like scrub and woodland. Abandonment of management permits biomass accumulation, which may be increased by enhanced N deposition (Britton *et al.*, 2001). The remaining species-rich *Nardus* grasslands need to be protected especially in countries where low air pollution currently limits the potential damage to these ecosystems.

However, regional variation in plant community composition means that grasslands may respond differently to atmospheric N deposition according to their abiotic environment, especially climatic conditions. Indeed, the extent to which increased N inputs will drive changes in plant productivity and species composition over the next century will depend on how N deposition interacts with other influential global change factors, such as climate warming, to influence the N retention of ecosystems (Magnani *et al.*, 2007; de Vries *et al.*, 2009; Turner & Henry, 2009; Churkina *et al.*, 2010). The impact of air pollution on terrestrial ecosystems and its relation to climate change are important issues, both on scientific and

policy level, which may be strongly dependent on the spatial variation of both climate and atmospheric deposition at local to regional scale.

In this paper, we provide a comprehensive analysis of recent climatic, N deposition and species composition changes to acid grasslands within the French Atlantic domain for the last 25 years. Three questions are addressed:

1. Have there been detectable changes in N deposition and climate over the last 25 years and if so what is the spatial distribution and magnitude of these changes?
2. Can changes in vegetation composition in acid grasslands over the 25 years be detected and are these changes dependent on initial community composition?
3. Can observed vegetation trends be linked to N deposition, climate or both, and at which scale?

Materials and Methods

Studied grasslands

The studied sites were nutrient-poor and calcifuge grasslands located within the Atlantic biogeographical area of France. They belong to the phytosociological *Nardetea strictae* class (Rivas-Goday & Rivas-Martinez, 1963) and the *Violion caninae* alliance (Schwickerath, 1944) and its vicarious eu-atlantic *Agrostion curtisii* alliance (De Foucault, 1986). At this biogeographical scale, atmospheric gradients are relatively strong for both N deposition and climate variables (Table 2.1). Management variation between the sites was minimized since these grasslands are extensively grazed or mown, and are not artificially fertilized.

Table 2.1. Description of all sites grouped according to their geographical location (Survey region). Number of vegetation records (n) in each region is indicated for present (Pres) and past records. Mean geographical coordinates of all vegetation records are given for longitude and latitude. Mean elevation was calculated for the present vegetation records only. Nitrogen deposition and climate variables of all sites are expressed as annual means for the period 1980-2005 (\pm standard error). Total N deposition values were obtained from the mean grid cell values of EMEP model. Mean temperature, annual precipitation and potential evapotranspiration (PET) were obtained from a spatial interpolation of observed data means on grid reference of the French Meteorological Office (METEO-FRANCE).

Survey region	n (Pres/Past)	Latitude/Longitude (decimal degrees)	Elevation (m)	N deposition (kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹)	Temperature (°C)	Precipitation (mm)	PET (mm)
Brittany	5/12	47.42/-2.41	99	18.3 (\pm 0.98)	11.0 (\pm 0.11)	1038 (\pm 64)	680 (\pm 10)
Limousin	4/46	45.79/1.83	599	14.2 (\pm 0.93)	9.8 (\pm 0.11)	1371 (\pm 15)	704 (\pm 6)
North Aquitaine	5/26	44.75/-1.04	60	9.3 (\pm 0.34)	13.5 (\pm 0.09)	1089 (\pm 38)	817 (\pm 8)
South Aquitaine	6/33	43.36/-1.43	198	11.1 (\pm 1.79)	14.2 (\pm 0.05)	1514 (\pm 12)	881 (\pm 7)
Vosges	5/20	49.04/7.52	257	14.7 (\pm 0.61)	9.8 (\pm 0.06)	918 (\pm 8)	686 (\pm 3)

To ensure homogeneity of studied grasslands, the selection of vegetation records was based on floristic similarity as established at the European scale by Stevens *et al.* (2010). Grasslands had to contain at least five characteristic species among grasses (*Agrostis capillaris* L., *Danthonia decumbens* (L.) DC., *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., *Festuca rubra* L./*ovina* L., *Luzula campestris* (L.) DC., *Nardus stricta* L.), sedges (*Carex pilulifera* L.), forbs (*Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Campanula rotundifolia* L., *Galium saxatile* L., *Polygala* spp. L., *Potentilla erecta* (L.) Rauschel) and mosses (*Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst).

Past and present vegetation records

A review of the phytosociological literature of acid grasslands (*Violion caninae*, Schwickerath, 1944 and *Agrostion curtisii*, De Foucault, 1986) was performed and allowed selection of appropriate areas where grasslands could be fitted to floristic criteria. A data set containing 137 past vegetation records from 1978 to 1990 was compiled from Brittany (Clément, 1978; Stieperaere, 1990), Limousin (Botineau *et al.*, 1986), North Aquitaine (De Foucault, 1986, 1993), South Aquitaine (De Foucault, 1986) and Vosges (Muller, 1986) regions. Geographical coordinates (latitude and longitude) were determined from information available in past vegetation records (Table 2.1). This initial dataset was used to explore changes in community composition over time through a stratified resampling of this vegetation type (Dullinger *et al.*, 2003; Haveman & Janssen, 2008).

Between May and September of 2007, 25 sites distributed in the pre-selected areas from past data were visited according to protocol established by Stevens *et al.* (2010) and located by their latitude, longitude and elevation coordinates (Table 2.1). Areas that were affected by animals, tracks or path or were in the rain shadows of trees or hedges were excluded from the survey. Areas with large amounts of *Juncus* sp. and woody species were also excluded to avoid respectively wetlands and unmanaged grasslands. In each grassland, five 2×2 m quadrats were randomly located. All vascular plants were identified to a plant species level and their cover was estimated from 1 to 10 using the domin scale (see Rich *et al.*, 2005).

Plant species occurrence, *i.e.* the number of sites where a species can be found compared to the total number of sites, was calculated in both past and present vegetation records. Occurrence reflects a frequency of species presence in an area, irrespective of their cover. Species abundance was also calculated in both past and present vegetation records, as the mean cover of one species for all the sites where the species was recorded (Hanski *et al.*, 1993).

Soil analyses

In each site visited in 2007, the upper 10 cm of the soil were sampled using a 5 cm diameter Dutch auger. Topsoil samples were collected from two opposing corners of each

quadrat and pooled for analysis. In all sites, three of the five collected samples were randomly selected and analysed to obtain a mean value.

The pH of fresh soil was measured after shaking 5 g soil with 25 ml deionised water and waiting for stable pH (pH/Ion 510 pH Meter, Eutech Instruments; Nijkerk, Netherlands). After drying at room temperature, soil texture was measured with fractions referred to clay, silt and sand (INRA laboratory of Arras, standard AFNOR NF X 31-107). These acidic soils required no decarbonation process. After destruction of the organic matter and ultrasonic dispersion, sands were separated using wet sieving. Silts and clays were separated according their time of sedimentation using the Robinson pipette method (Day, 1965). Soil composition was expressed as the percentage of each fraction. Soil was ground to a fine powder and analysed for total C and N content (CNS Analyser, Elementar Model; Stockport, UK). Plant-available phosphorus (P) content was measured using an Olsen extraction and a colorimetric determination. For measurements of soil exchangeable ions (NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-}), samples were shaken with 0.4 M NaCl and analysed using an auto-analyser by colorimetric determination. For all samples, metal concentrations (Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Si^{2+} , Zn^{2+}) were determined using an ICP-MS. Concentrations of all elements were expressed in mg kg^{-1} dry soil.

Plant analyses

For the 25 sites in the 2007 surveys, samples of the *Agrostis capillaris* grass were collected within plant communities where the quadrats were located. Approximately 10 g of above-ground material were collected in each site and washed briefly in deionised water. After oven drying for 72 hours at 55°C, samples were ground to < 2mm before analyses. The total C and N contents were measured on an autoanalyser (CNS Analyser, Elementar Model; Stockport, UK). To determine plant tissue P, a dry ashing method (Chapman & Pratt, 1985; Ryan *et al.*, 2001) was used followed by a Barton colour complex (MAFF, 1986). Contents of all elements were expressed as a percentage of dry weight.

Nitrogen deposition and climate data

Total, reduced and oxidized N deposition data were obtained from the EMEP (European Monitoring and Evaluation Programme) model (Simpson *et al.*, 2003; Fagerli *et al.*, 2004), which is the most accurate N deposition model available in France. Total N deposition was based on wet and dry deposition of reduced (NH_3 and NH_4^+) and oxidized (NO_2 , NO_3^- and HNO_3) N inputs. Mean annual N deposition was calculated from 13 cells of EMEP 50×50 km grid at the location of each past and present vegetation record. In each site, averages for a ten year period for annual reduced, oxidized and total N deposition were calculated from 1980-1990 decade (past data) or 1995-2005 decade (present data). For the 1980-1990, data were only available for three of the years: 1980, 1985 and 1990.

Mean annual temperature, annual precipitation (P) and mean annual potential evapotranspiration (PET), were obtained from the French Meteorological Office (METEO-FRANCE) from 1980 to 2005. For each location of past and present vegetation records, climatic data were based on spatial interpolation on $0.125^{\circ} \times 0.125^{\circ}$ grid reference of observed data. Water availability was characterized in term of the difference between annual precipitation and potential evapotranspiration (P-PET). Similarly to N deposition data, mean climatic data were calculated either from past (1980-1990; 11 years) or present (1995-2005; 11 years) decades according to the type of vegetation records.

Statistical analysis

To homogenise the vegetation dataset, the cover-abundance coefficients scale for phytosociological relevés used in past dataset (Braun-Blanquet, 1932, 1964) was converted to fit with the domin scale used in the present dataset (see Rich *et al.*, 2005). For present vegetation records, a mean abundance coefficient was calculated from the five quadrats. Species occurring in only one record were not considered as they cannot be interpreted reliably.

A first correspondence analysis (CA1) was performed on the complete dataset of past and present vegetation records ($n = 162$). A hierarchical clustering analysis was performed to test the occurrence of different community types (CTs) within the species-rich *Nardus* grasslands (NARD). A community type (CT, *i.e.* a cluster) can therefore include both past and present vegetation data to draw a comparison of floristic composition between the two decades within a homogeneous species pool. Indicator species were identified for each community type with IndVal method (Dufrene & Legendre, 1997) which uses both the specialization and the occurrence of the species in the dataset.

To test vegetation differences over time, a cluster including only past vegetation records was excluded, meaning that this vegetation type formerly described in the literature was not sampled in our present vegetation records. Then, a second correspondence analysis (CA2) on the remaining vegetation records was carried out allowing interdate comparisons at the French Atlantic Domain (FAD) and CT scale. To avoid sample size effects in the comparison between numerous past vegetation records and present ones, a random resampling method without replacement ($n=10000$) was used for past vegetation records coordinates along the axes 1 and 2 of the CA2. The number of vegetation records used to calculate the mean coordinate of past vegetation was equal to the number of vegetation records occurring in the present data. Overlapping between confidence intervals at 95%, 99% and 99.9%, obtained by random resampling for past vegetation records, and mean coordinates for present vegetation records was examined to test significant differences in plant composition between the two dates. Finally, a spearman's rank coefficient correlation between vegetation records coordinates along axis 1 and 2 and environmental variables was calculated to assess

ecological gradient in CA2 (Becker *et al.*, 1988). Only significant correlations with $r > 0.4$ were selected.

In order to determine main species turnover over time, differences in species occurrence and abundance were examined for FAD and CT scale in both past and present vegetation records. Within species which occurred in at least 20% of the past vegetation records, species showing a difference in abundance between present and past vegetation records exceeding 2% were selected.

Temporal changes in N deposition and climatic variables were tested between the two decades of interest (1980-1990 and 1995-2005) using one-way analysis of variance (ANOVA). Data and residuals distribution were checked for normality with the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variance with the Bartlett's test. All analyses were conducted using R (R.2.10.1) (R foundation for statistical computing, Vienne, Austria).

Results

Classification and description of plant assemblages

The hierarchical cluster analysis on all vegetation records (NARD; $n=162$) discriminated five CTs on the basis of their floristic composition. CTs were described by their plant assemblage, their phytosociological association and coded following their main characteristic grass species (Table 2.2). Each CT can be related to one main geographic origin. However, for three of the five CTs, records belong to several geographic origins. AGRO was thermo-Atlantic to eu-Atlantic CT, dominated by *Agrostis capillaris* and *A. curtisii* (Clément, 1978, Stieperaere, 1990). AVEN grasslands were characterised by *Avenula pratensis* (Muller, 1986) and FEST were *Festuca rubra* grasslands (Botineau *et al.*, 1986). Within thermo-atlantic *Pseudarrhenatherum longifolium* grasslands, two CT arose: one characterised by *Carex pilulifera* (PSEC) and another characterised by *Simethis planifolia* (PSES) (De Foucault 1986, 1993). PSES was represented in our dataset only by past vegetation records, suggesting that this CT was not resampled in south-west of France in 2007. Therefore, PSES was not considered for the temporal analyses in this study, reducing the dataset to a total of 141 vegetation records.

Table 2.2. Plant community types (CTs) as defined by a cluster analysis after the first Correspondence Analysis (CA1) on the 162 vegetation records sampled. Corresponding phytosociological associations and characteristic species were given; n: number of present (Pres) and past vegetation records in each survey region.

CT	Phytosociological association	Characteristic species	n (Pres/Past)
AGRO	<i>Agrostietum capillaris-curtisii</i>	<i>Agrostis capillaris</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Galium saxatile</i> , <i>Polygala serpyllifolia</i> , <i>Danthonia decumbens</i>	5/10 Brittany 3/0 North Aquitaine 1/1 South Aquitaine
AVEN	<i>Viscario-Avenetum pratensis/Aveno pratensis-Genistum sagittalis</i>	<i>Avenula pubescens</i> , <i>Euphorbia cyparissias</i> , <i>Festuca filiformis</i> , <i>Potentilla neumanniana</i> , <i>Thymus pulegiodes</i>	5/20 Vosges
FEST	<i>Galio saxatilis-Festucetum rubrae</i>	<i>Briza media</i> , <i>Centaurea jacea</i> var. <i>nigra</i> , <i>Conopodium majus</i> , <i>Leucanthemum vulgare</i> , <i>Silene vulgaris</i>	4/46 Limousin 2/0 North Aquitaine 0/2 Brittany
PSEC	<i>Carici piluliferae- Pseudarrhenatheretum longifolii</i>	<i>Agrostis curtisii</i> , <i>Brachypodium pinnatum</i> , <i>Erica vagans</i> , <i>Pteridium aquilinum</i> , <i>Cirsium filipendulum</i>	5/32 South Aquitaine 0/5 North Aquitaine
PSES	<i>Simethi planifoliae- Pseudarrhenatheretum longifolii</i>	<i>Agrostis curtisii</i> , <i>Erica scoparia</i> , <i>Pseudarrhenatherum longifolium</i> , <i>Simethis planifolia</i> , <i>Ulex minor</i>	0/21 North Aquitaine

Changes in nitrogen deposition and climate over time

Significant variations in N deposition were found at the different CT sites between the two decades (1980-1990 and 1995-2005) (Figure 2.1). Total N deposition was elevated above background levels but with all values observed below $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ and showed a general decreasing trend occurred over the past 30 years (Figure 2.1a). Oxidized N deposition showed reductions for all sites considered together (NARD), but also for FEST and AVEN sites separately (Figure 2.1b). On the contrary, for the same decades, reduced N deposition indicated a significant decrease only for FEST sites (Figure 2.1c). Reduction in N deposition for FEST sites resulted both from oxidized and reduced N deposition, whereas N deposition for AVEN sites was only induced by oxidized N deposition. Overall, annual mean temperature changed significantly between 1980s and recent years (Figure 2.2a). In our data set, temperature increased globally by 1.1°C , with strong variation according to the CT sites from 0.9°C for AVEN to 1.8°C for AGRO and 1.9°C for FEST while there was no significant change for PSEC sites. Analysis of variance showed a significant reduction in mean annual precipitation by 183 mm occurring over the past 30 years for all sites (NARD) (Figure 2.2b). At the CT scale, precipitations in FEST sites were characterised by a reduction of 194 mm. During the same period, potential evapotranspiration showed stability for all sites (NARD) but presented significant changes for AGRO (+113 mm) and AVEN sites (+22 mm) (Figure 2.2c). P-PET showed a dramatic decrease between 1980-1990 and 1995-2005 for all sites (NARD: -207 mm) but also for FEST sites (-223 mm) (Figure 2.2d).

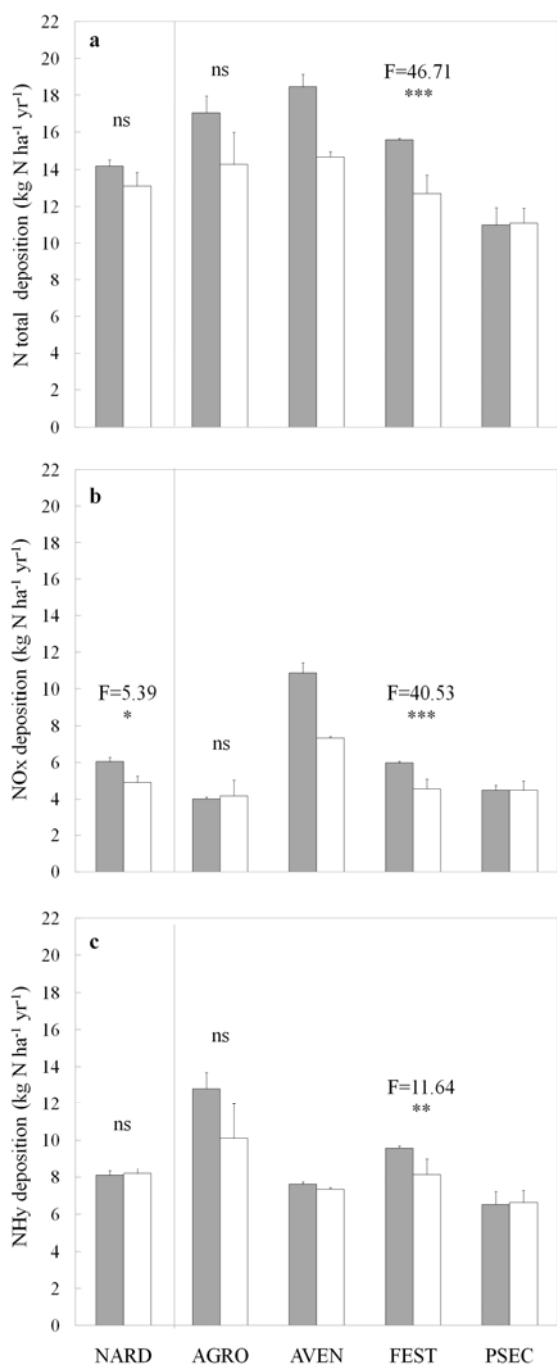


Figure 2.1. Variation in nitrogen deposition for all sites sampled in the FAD (NARD) and CT level between past and present vegetation records; (a) total, (b) oxidized and (c) reduced N deposition. Means \pm standard error were calculated for the 1980-1990 (grey bars) and 1995-2005 (white bars) decades. Results of one-way ANOVAs were summarised above the bars. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; (*): $P < 0.1$; ns: not significant. For AVEN and PSEC, no statistical analysis have been performed due to the number of EMEP grids used ($n = 2$).

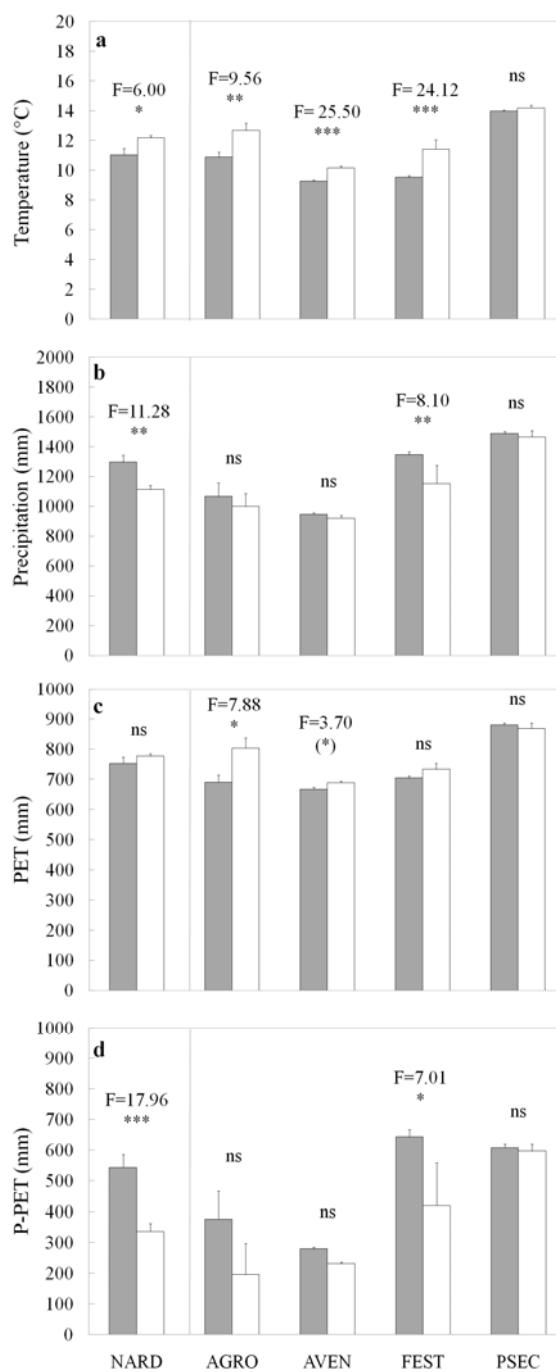


Figure 2.2. Climate variation for all sites sampled in the FAD (NARD) and CT level between past and present vegetation records; (a) mean annual temperature, (b) annual precipitation (P), (c) annual potential evapotranspiration (PET) and (d) difference between P and PET (P-PET). Means \pm standard error were calculated for the 1980-1990 (grey bars) and 1995-2005 (white bar) decades. Results of one-way ANOVAs were summarised above the bars: ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; (*): $P < 0.1$; ns: not significant.

Species composition gradients and underlying ecological factors

The first two ordination axes of the CA2 (210 species \times 141 vegetation records) accounted for 14.2% of the total variation in the ordination (eigenvalues: $\lambda_1 = 0.084$, $\lambda_2 = 0.058$) (Figure 2.3a, b). Species accounting for floristic gradients were respectively for axis 1: *Asphodelus albus*, *Euphorbia angulata* and *Gentiana pneumonanthe* opposed to *Anthyllis vulneraria*, *Koeleria macrantha* and *Leontodon autumnalis*, and for axis 2: *Avenula pratensis*, *Genista sagittalis* and *Trifolium medium* opposed to *Arnica montana*, *Gentiana lutea* and *Stellaria holostea*. Examining correlations existing between CA2 axes coordinates and environmental variables of sites (Table 2.3) can potentially provide hypotheses and evidence for the ecological significance of plant community variation. Axis 1 was related to wide regional ecological differences, as well as climatic and N deposition variables. It was positively correlated to latitude and longitude, which reflects a decrease in temperature and potential evapotranspiration. Axis 1 was related to biogeography and climate, which discriminated between the most atlantic CTs (AGRO and PSEC) at the negative end and driest and continental CTs (AVEN and FEST) at the positive end of the gradient. The increase of nutrient availability (N and P) in soils and vegetation along axis 1 was explained by the high correlation of oxidized and total N deposition along axis 1. Indicators of acidification (pH and Al and SO₄ concentration) were negatively correlated to axis 1, topsoil pH being more acid and Al and SO₄ concentration higher in the negative part of axis 1.

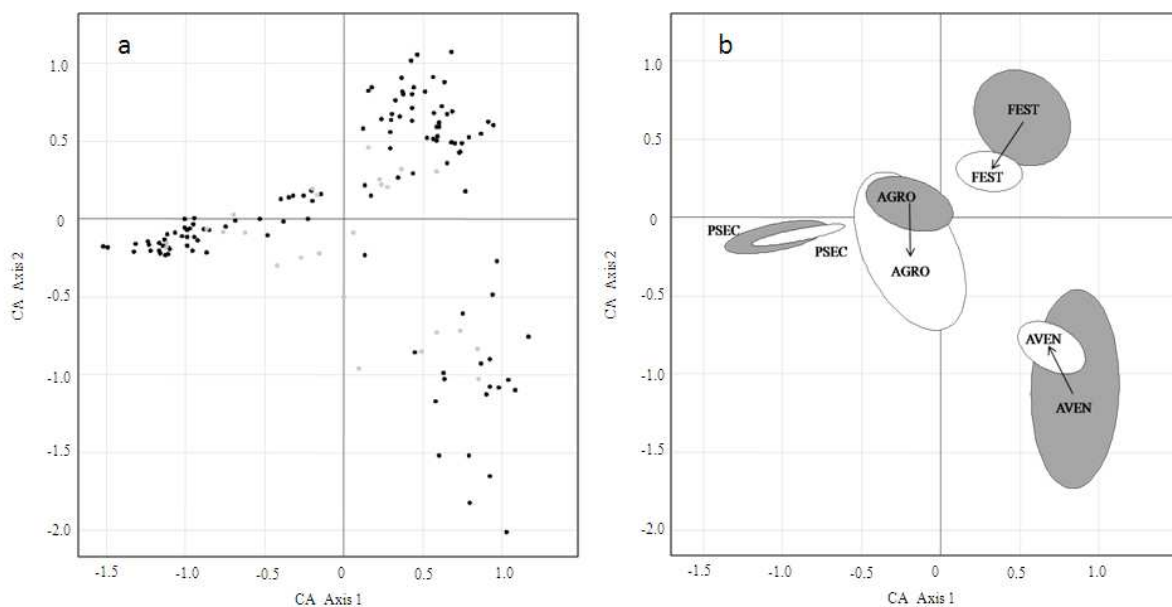


Figure 2.3. Correspondence Analysis (CA2) of the data set (141 sites \times 210 species) including past and present vegetation records. a) Distribution of past (black plots) and present (grey plots) records b) Community type (CT) was represented by the barycentre of the vegetation records distribution at the two periods: 1980s (grey ellipse) and present data (white ellipse). Arrows are indicated when the shift between the barycentre of the two periods was significant within the same CT. First two axes represent 14.2% of the total variation in species composition.

This increase in soil acidification was consistent with a low level of soil nitrate content in thermo-atlantic communities. This impoverishment in nitrate was related to both the lowest level of N deposition and the highest precipitation amount which involves large leaching and therefore acidification. Axis 2 was positively correlated to a water availability (P-PET), reduced N deposition and soil texture and chemical content. Clay percentage of soils was related to water availability suggesting an increase in alteration processes in soils. At the same time, cation concentration increases especially for elements tightly related to the chemical composition of bedrocks (K, Mg, Si, Al) and/or involved in acidification processes (SO₄, Al). C content of plants was negatively related to all these variables (Table 2.3).

Table 2.3. Correlations between the coordinates for vegetation records along the first two axes of the second Correspondence Analysis (CA2) and different environmental parameters, n: number of vegetation records available for correlations. For each axis, r Spearman correlation index was given as well as the significance of the correlation when $r > 0.4$: ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Parameters	n	r with significance	
		Axis1	Axis2
<i>Geography</i>			
Latitude (decimal degrees)	141	+0.74 ***	-
Longitude (decimal degrees)	141	+0.82 ***	-
<i>Climate</i>			
Annual mean temperature (°C)	141	-0.80 ***	-
Annual precipitation (P) (mm)	141	-0.51 ***	-
Annual potential evapotranspiration (PET) (mm)	141	-0.72 ***	-
P-PET (mm)	141	-	+0.55 ***
<i>Deposition</i>			
NO _x deposition (kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹)	141	+0.80 ***	-
NH _y deposition (kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹)	141	+0.43 ***	+0.55 ***
N tot deposition (kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹)	141	+0.70 ***	-
<i>Soil</i>			
pH	25	+0.52 **	-
Clay (%)	25	-0.62 ***	+0.41 *
Silt (%)	25	-0.47 *	-
Sand (%)	25	+0.60 **	-
C:N ratio	25	-0.73 ***	-
N:P ratio	25	-0.62 **	-
NO ₃ (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	+0.77 ***	-
Al (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	-0.57 **	+0.40 *
K (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	-	+0.57 **
Mg (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	-	+0.57 **
SO ₄ (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	-0.50 *	+0.45 *
Si (mg kg ⁻¹ dry soil)	25	-	+0.59 **
<i>Vegetation</i>			
C (%)	21	-	-0.53 *
N (%)	21	+0.58 **	-
P (%)	21	+0.73 ***	-
C:N ratio	21	-0.56 **	-
N:P ratio	21	-0.65 **	-

Characterisation of community changes and species trends

At the FAD scale, species-rich *Nardus* grasslands (NARD) showed no difference in floristic composition between the two decades studied from the axis 1 of CA2, whereas very significant differences were found for axis 2 (Table 2.4). At the CT scale, consistent temporal trends were statistically significant along axes 1 and 2 (Table 2.4). The magnitude of vegetation changes was defined as the difference of mean coordinates along CA2 axis between 1980s and 2007 records. These changes were community-dependant, and when they were significant, they showed the same direction of change along CA2 axis (Table 2.4, Figure 2.3a, b). CTs which showed the same directional changes to the negative part of the axes were AVEN and FEST for axis 1 and AGRO and FEST for axis 2. During the last 25 years, many species have decreased at the FAD scale in occurrence and abundance whatever the functional type of species (forbs, legumes and grasses) (Table 2.5).

At the CT scale, but not at the FAD scale (NARD), some species disappeared in the present dataset although they were originally common (more than 20%) in past vegetation records (Present occurrence = 0; Table 2.5). Species that totally disappeared in the present dataset with the strongest decrease in abundance were mostly forbs (*Cirsium filipendulum* for AGRO; *Arnica montana*, *Gentiana lutea*, *Rhinanthus minor* and *Phyteuma spicatum* for FEST; *Asphodelus albus* for PSEC), and to a lesser extent legumes (*Genista pilosa* and *Genista sagittalis* for AVEN) and grasses (*Avenula pratensis* for AVEN). In contrast, some grasses were detected in the 2007 data set while they were absent in past vegetation records at the CT scale, like *Deschampsia flexuosa* for AGRO and AVEN, *Luzula campestris* for PSEC and *Nardus stricta* for AGRO (data not shown). Moreover, some species increased in occurrence and abundance, such as the grasses (*Molinia caerulea* for AGRO; *Festuca filiformis*, *Luzula campestris* and *Nardus stricta* for AVEN; *Danthonia decumbens* for FEST) and the forb: *Hieracium pilosella* for AVEN (Table 2.5).

Table 2.4. Comparison of mean coordinates between past and present (Pres) vegetation records for all vegetation records sampled in the FAD (NARD) and CT level. Differences in coordinates were calculated along the first two axes of the second Correspondence Analysis (CA2 *i.e.* without PSES records) accounting for 14.2% of total variation. Coordinates of past vegetation records were obtained by averaging coordinates of *n* randomly chosen vegetation records 10000-times, *n* being the number of present vegetation records in the corresponding community type. Present coordinates were expressed as the mean of the *n* vegetation records. Significance of the temporal variation in coordinates: ***<0.001; **<0.01; *<0.05; ns: not significant.

Community type	Axis 1			Axis 2		
	Hist	Pres	Difference	Hist	Pres	Difference
NARD	0.013	-0.037	-0.050 ns	-0.061	-0.195	-0.134 ***
AGRO	-0.198	-0.195	0.003 ns	0.086	-0.215	-0.301 ***
AVEN	0.848	0.700	-0.148 *	-1.096	-0.831	0.265 ns
FEST	0.513	0.307	-0.207 **	0.637	0.295	-0.342 ***
PSEC	-1.040	-0.901	0.140 ns	-0.127	-0.112	0.014 ns

Table 2.5. Temporal change in species occurrence and abundance for all vegetation records sampled in the FAD (NARD) and CTs level; n: total number of species detected in 1980s and 2007. Species occurrence was a frequency of occurrence in either present (Pres) or past vegetation records. Abundance variation was calculated as the difference of total cover of species between past and present vegetation records. Only the most common and variable species (*i.e.* occurrence \geq 20% in past vegetation records and abundance \geq 2%) were considered (in bold, species in abundance variation \geq +/- 3%).

Community type	n	Decreasing species	Distribution (%) Pres (Hist)	Abundance variation (%)	Increasing species	Distribution (%) Pres (Hist)	Abundance variation (%)
NARD	210	<i>Deschampsia flexuosa</i>	28 (28)	-2.80			
		<i>Pteridium aquilinum</i>	44 (46)	-2.62			
		<i>Trifolium repens</i>	32 (27)	-2.43			
		<i>Anthoxanthum odoratum</i>	76 (59)	-2.40			
		<i>Centaurea jacea var. nigra</i>	36 (39)	-2.31			
		<i>Holcus lanatus</i>	56 (48)	-2.24			
		<i>Briza media</i>	20 (38)	-2.08			
		<i>Conopodium majus</i>	16 (28)	-2.02			
AVEN	110	<i>Avenula pratensis</i>	0 (25)	-6.63	<i>Nardus stricta</i>	20 (25)	7.30
		<i>Genista sagittalis</i>	0 (50)	-4.37	<i>Luzula campestris</i>	100 (85)	4.38
		<i>Genista pilosa</i>	0 (30)	-3.76	<i>Festuca filiformis</i>	80 (100)	3.37
		<i>Rhinanthus minor</i>	0 (30)	-2.77	<i>Hieracium pilosella</i>	100 (90)	2.27
		<i>Thesium linophyllum</i>	0 (30)	-2.62			
		<i>Euphrasia stricta</i>	0 (45)	-2.52			
		<i>Agrostis vinealis</i>	0 (30)	-2.34			
		<i>Stellaria graminea</i>	0 (40)	-2.34			
		<i>Stachys officinalis</i>	0 (30)	-2.31			
		<i>Succisa pratensis</i>	0 (40)	-2.16			
		<i>Molinia caerulea</i>	0 (30)	-2.09			
		<i>Campanula rotundifolia</i>	0 (35)	-2.03			
		<i>Galium pumilum</i>	0 (45)	-2.00			
		AGRO	118	<i>Festuca rubra</i>	67 (73)	-6.07	<i>Molinia caerulea</i>
<i>Erica cinerea</i>	56 (27)			-5.64			
<i>Cirsium filipendulum</i>	0 (27)			-5.45			
<i>Agrostis canina</i>	11 (27)			-5.22			
<i>Holcus mollis</i>	11 (55)			-4.41			
<i>Veronica officinalis</i>	22 (45)			-2.72			
<i>Lathyrus linifolius subsp. montanus</i>	11 (27)			-2.45			
<i>Galium saxatile</i>	22 (73)			-2.34			
<i>Plantago lanceolata</i>	56 (27)			-2.32			
<i>Wahlenbergia hederacea</i>	11 (27)			-2.19			
FEST	111			<i>Gentiana lutea</i>	0 (33)	-6.10	<i>Danthonia decumbens</i>
		<i>Rhinanthus minor</i>	0 (21)	-6.08			
		<i>Arnica montana</i>	0 (21)	-5.07			
		<i>Deschampsia flexuosa</i>	17 (38)	-4.15			
		<i>Phyteuma spicatum</i>	0 (31)	-3.00			
		<i>Dactylorhiza maculata</i>	0 (27)	-2.74			
		<i>Briza media</i>	50 (63)	-2.74			
		<i>Trifolium repens</i>	67 (38)	-2.62			
		<i>Centaurea jacea var. nigra</i>	50 (75)	-2.59			
		<i>Conopodium majus</i>	33 (58)	-2.40			
		<i>Plantago lanceolata</i>	67 (58)	-2.33			
		<i>Achillea millefolium</i>	83 (46)	-2.29			
		<i>Stachys officinalis</i>	50 (50)	-2.23			
		PSEC	101	<i>Asphodelus albus</i>	0 (24)	-3.29	
<i>Brachypodium pinnatum</i>	40 (54)			-3.24			
<i>Festuca rubra</i>	100 (84)			-3.20			
<i>Hieracium pilosella</i>	100 (65)			-2.86			
<i>Solidago virgaurea</i>	0 (38)			-2.79			
<i>Euphorbia angulata</i>	0 (35)			-2.79			
<i>Gentiana pneumonanthe</i>	0 (24)			-2.78			
<i>Scilla verna</i>	40 (38)			-2.25			
<i>Pteridium aquilinum</i>	100 (100)			-2.15			
<i>Blechnum spicant</i>	0 (22)			-2.05			

Discussion

This paper attempts to detect any vegetation changes that have occurred in the French Atlantic acid grasslands in the last 25 years and uses correspondence analysis to identify the potential contribution of N deposition in the context of a changing climate. Achieving this objective was made difficult by two factors. Firstly, the time span of the study was relatively short (25 years at the most) compared to that generally considered in resampling approaches (40-70 years; *e.g.* Haveman & Janssen, 2008; Duprè *et al.*, 2010; McGovern *et al.*, 2011). Secondly, the level of N deposition (11-18 kg N ha⁻¹ yr⁻¹) was moderately elevated above background levels in more pristine areas (1-5 kg N ha⁻¹ yr⁻¹; Galloway *et al.*, 2004), while comparative studies performed at national or continental scale generally combine low and high levels (5-50 kg N ha⁻¹ yr⁻¹; Maskell *et al.*, 2010; Stevens *et al.*, 2004, 2010). In the French Atlantic Domain (FAD), over the last 25 years, the general trend has been decreasing N deposition (Fagerli & Aas, 2008) as well as climatic changes with an increase of mean temperature and a decrease of water availability (IPCC, 2007). If these trends are detectable, then we expect that the effects on vegetation for the N driver should be strong where deposition levels have poorly decreased, *i.e.* when deposition is high and the most stable. Similarly, climatic impacts should be the strongest where climatic changes are the most pronounced.

Temporal changes in both N deposition and climate

Both N deposition and climate changes are detected over the period of the study at the FAD scale. For atmospheric N deposition, the significant decrease of oxidized N deposition observed in our study is consistent with the oxidized N emissions reduction observed in France (Serveau *et al.*, 2010) and N deposition trends observed during a comparable period in the UK (Fowler *et al.*, 2005) and in Europe (Fagerli & Aas, 2008). For climatic variables, changes shown in our study agree with results from the literature (IPCC, 2007).

These time-scale variations throughout the FAD conceal spatial variations corresponding to local heterogeneities of N deposition and climate changes. Spatial variations in N deposition changes are especially important, since changes in total N and reduced N deposition are detected at a local scale but not at the FAD scale. Especially, in FEST and AVEN sites, significant decrease of total N deposition was recorded, mainly due to a decrease in oxidized N deposition during the period of the study (Fagerli & Aas, 2008). The level of N deposition observed was within the total range of the critical loads recommended for acid grasslands (10-15 kg N ha⁻¹ yr⁻¹; Bobbink *et al.*, 2011), although the relevant range of the critical loads depends on abiotic factors (Achermann & Bobbink, 2002). For example, cold temperature and N limitation are likely to increase sensitivity of ecosystems to N deposition. As regards our data, FEST and AVEN sites are likely to be the most sensitive with a critical load ranging around 10 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ (Achermann & Bobbink, 2002) while the upper part of the critical loads range, *i.e.* around 15 kg N ha⁻¹ yr⁻¹, is appropriate to the most thermo-

atlantic, and therefore the less sensitive, sites (AGRO and PSEC). Furthermore the most sensitive sites have also experienced the highest loads of oxidized N deposition. In spite of uncertainties for ammonia deposition stemming from the impacts of local sources (Sutton *et al.*, 1995; Erisman *et al.*, 2005; Erisman *et al.*, 2007), EMEP data reveal that FEST sites are the only ones to experience a decrease in reduced N deposition, although they are among the highest loads, probably due to local changes in agricultural management.

Spatial variation is also detectable in climatic variables. The southern and warmer sites sampled in the FAD, *i.e.* PSEC sites, are the only ones to avoid an increase in temperature. A significant decrease in water availability as a consequence of a decrease in precipitation may be detected in FEST sites only. Such spatial differences are likely to induce changes in the hierarchical balance of components of global change as regards geographical location. Therefore, the interaction between N deposition and climate change effects needs to be studied carefully to identify the key factors driving vegetation changes.

Among atmospheric variables, it is clear that climate changes are mainly detectable at the FAD scale, whereas N deposition changes are mainly dependant of local variation, affecting central and northern areas of French Atlantic acid grasslands.

Spatial and temporal trends in vegetation patterns: what are the main potential drivers?

Overall floristic stability, with no significant species shift at the FAD scale, suggests similarity in the underlying ecological factors at work for both periods. This can be explained by the predominant biogeographical gradient, still perceptible, that has shaped species pools variations (Bensettiti *et al.*, 2005). This gradient is synthesised by geographical position (latitude and longitude) and by drivers such as climate variables (temperature and PET) and soil biogeochemistry (nutrient content and pH), all variables linked to the first axis of CA2.

However, species composition within CTs is not constant over time and differences in vegetation are especially noticeable at the local scale. The increasing gradient of available N, which is associated to a gradient of oxidized N deposition in our study, is consistent with a decrease of soil C:N ratio. Soil nitrate content can follow the gradient of N content in vascular plants (Carroll *et al.*, 2003; Pilkington *et al.*, 2005) which was not apparent at a European scale (Stevens *et al.*, 2011a). In this study, the significant response of N content in plant tissues arises from *A. capillaris*, previously shown to be sensitive to N addition (Horswill *et al.*, 2008). The second axis of CA2 is mostly related to water availability and reduced N deposition but also to soil base cations. Chronic summer drought, *e.g.* water availability, appears to be one of the major events to influence productivity and species richness in unfertile grasslands (Grime *et al.*, 2008). Moreover, ecosystems do not seem to be resilient to soil pH decrease as recovery in soil base saturation is less rapid and complete than soil pH recovery itself (McGovern *et al.*, 2011).

Differences in grasslands composition over time are supported by species turn-over examination. Our method, which considers only species that had an abundance of greater than 20% in the past vegetation records, provides a cautious indication of present changes. Our results point out the decrease of forb cover in response to N deposition (Stevens *et al.*, 2006, 2010). The decrease or absence of legumes such as *Genista pilosa* at local scale could mean that N deposition rather than biological N fixation is dominating N supply and could also explain the decrease of the hemi-parasite *Rhinanthus minor* (Ameloot *et al.*, 2008). The decreasing cover of *R. minor* in response to higher N availability (Smith *et al.*, 2002) impacts the grassland ecosystem structure and function by allowing dominant grasses to proliferate and suppress forb cover, potentially decreasing the plant diversity (Press & Phoenix, 2005).

Footprints of N deposition and climate change on vegetation

Effects of climate change can operate both at the FAD and local scale and may affect vegetation turn-over. The level of N deposition observed was within the range of the critical loads suggesting a weak impact of N deposition even if effects of low background deposition on acid grasslands are reported (Clark & Tilman, 2008; Stevens *et al.*, 2010). Effects of N deposition are also dependent on local variation due to difference in N deposition form. Vegetation changes experienced in AVEN along axis 1 are consistent with the vicinity of Vosges region with industrial activities in France and in neighbor countries, contributing to high oxidized N deposition (Fowler *et al.*, 1998). Vegetation changes along axis 2 in AGRO sites, corresponding mainly to Brittany, are consistent with a response to the highest reduced N deposition levels as Brittany region has one of the most intensive agriculture in France (Asman *et al.*, 1998; Aneja *et al.*, 2001). Differences in the scale effect between climate change and N deposition may induce a hierarchical effect of these components on ecosystems (Pan *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2011b) and interactive effects at the same scale (Sala *et al.*, 2000; Majdi & Ohrvik, 2004; Turner & Henry, 2009). N deposition and climate interactions are known to alter the carbon balance in terrestrial ecosystems (Churkina *et al.*, 2010) or the dynamics of vegetation (Britton *et al.*, 2001) but they can act independently for example on carbon dynamics (Pan *et al.*, 2009) or on soil properties (Papanikolaou *et al.*, 2010). Moreover, an N deposition signal was detected, despite the short gradient and the short period initially described, probably because the sites that experience the highest loads were also likely to be the most sensitive, due to the interactive effects between N deposition and climate. The strongest change in vegetation (*i.e.* species turn-over along both axis 1 and 2) was detected in the *Festuca* grasslands corresponding to sites that experienced the highest chronic N deposition and the highest increase in mean temperature. Conversely, the *Pseudarrhenatherum* grasslands, with no significant vegetation trend, are also the sites that are the more stable as regards climate with the lowest level of N deposition. The magnitude of vegetation responses to climate and atmospheric changes depends on local variation in N deposition and climatic changes, on the interaction between these factors. Indeed, climate changes and N deposition are likely to act as drivers *per se* of plant communities, while

climate may also influence ecosystem sensitivity to N deposition and *visa versa*. However a hierarchy is hardly demonstrable without improved local models that are needed for calculations of these changes in the future (Zavaleta *et al.*, 2003).

At the species level, N deposition is expected (1) to increase the potential for competition exclusion and shift selection pressure towards species able to capitalize on elevated N availability (Wedin & Tilman, 1993; Hautier *et al.*, 2009) and (2) to impact species by exceeding their physiological limits of acid tolerance and nutrient demand (Horswill *et al.*, 2008). The species turn-over results show a general tendency to gain grasses at the expense of forbs (Duprè *et al.*, 2010; Maskell *et al.*, 2010). In our study, the extent of grasses such as *Nardus strictae* and *Molinia caerulea* is consistent with an increased level of N availability and loss of other grasslands species (Tomassen *et al.*, 1999; Hartley & Mitchell, 2005; Kleijn *et al.*, 2008). It has also been observed that rare species such as *Arnica montana* or *Dactylorhiza maculata* disappeared from these grasslands before grasses started to dominate over the vegetation because they are extremely sensitive to acidification and ammonium accumulation (van den Berg *et al.*, 2005; Kleijn *et al.*, 2008; De Graaf *et al.*, 2009). Similarly, climate changes can disadvantage the less tolerant species, especially those species sensitive to drought and warmer conditions. Indeed, global warming is known to change species distribution and therefore biogeographical limits for species, particularly in mountain areas (Lenoir *et al.*, 2008). Such changes could also be perceptible at lower altitude especially in grasslands sites with the least nutrient limitation (AVEN and FEST) where N deposition is not a confounding factor (Gilbert *et al.*, 2003; Falkengren-Grerup *et al.*, 2006). The species turn-over detected in these hilly communities indicates that endangered mountains species, like *Arnica montana* and *Gentiana lutea* are likely to be the affected in their distribution (Grabherr *et al.*, 1994). These results could provide more evidence of indirect effects of N deposition by increasing susceptibility of plants to frost (Caporn *et al.*, 2000; Sheppard & Leith, 2002). The vegetation appears to be sensitive to the cumulative amounts of N deposition especially in the sites where the loads of N are in the upper range of the critical loads for acid grasslands (Bobbink *et al.*, 2010b) and where climate is cool (AVEN and FEST sites).

Conclusion

Impact of global change on vegetation is complex because of the many ecological factors involved. By comparing vegetation data over a relatively short time span and in the context of a range of N deposition rates around the critical load range, this study provides evidence that the effects of cumulative N deposition on species composition are variable depending on spatial scale. This is because grasslands experiencing high oxidized or reduced N deposition levels respond locally with floristic and soil effects. However, these changes are always associated with climatic changes, suggesting that N deposition is a clear driver of grassland composition at more local scales whereas climate changes remain the predominant driver at the FAD scale. Climatic factors influence composition changes in grasslands at both

local and FAD scales, especially in the most continental and hilly community sites where they are likely to explain community sensitivity to N deposition. Therefore, although it was not possible to disentangle the single effects of N deposition and climate change, this study allowed us to differentiate a scale effect and to suggest an interactive effect between both factors. To see the complete picture and understand processes at work, particularly N deposition and climate interactions, future research is needed to complement long-term and large scale comparative studies with local studies associated to short term and fine-grain trends in contrasting bioclimatical areas. This is of particular importance in order to implement conservation policies and to provide meaningful management of valuable sites.

Acknowledgements

This work was funded by the European Science Foundation through the EURODIVERSITY-programme and national funds were provided by ADEME and Aquitaine Regional Council. We thank Laurence Galsomies (ADEME) for help in providing financial support. We are grateful to David Gowing as the co-ordinator of the BEGIN project and to Edu Dorland and Graham Howell who assisted with laboratory work. We thank Bruno de Foucault, Michel Botineau and Herman Stieperaere for providing vegetation records. We thank the CEA (Centre d'Energie Atomique) CESTA, the airfields of Bordeaux Léognan Saucats and Arcachon and private land owners who gave permission for sampling.

References

- Achermann B, Bobbink R (2002) In: *Empirical Critical Loads for Nitrogen*, Vol. 164. Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape, Berne.
- Ameloot E, Verlinden G, Boeckx P, Verheyen K, Hermy M (2008) Impact of hemiparasitic *Rhinanthus angustifolius* and *R.-minor* on nitrogen availability in grasslands. *Plant and Soil*, **311**, 255-268.
- Aneja VP, Roelle PA, Murray GC, *et al.* (2001) Atmospheric nitrogen compounds II: emissions, transport, transformation, deposition and assessment. *Atmospheric Environment*, **35**, 1903-1911.
- Asman WAH, Sutton MA, Schjerring JK (1998) Ammonia: emission, atmospheric transport and deposition. *New Phytologist*, **139**, 27-48.
- Becker, RA, Chambers, JM, Wilks, AR (1988) *The New S Language*. Pacific grove, CA, USA, Wadsworth & Brooks/Cole.
- Bensettiti F, Boulet V., Chavaudret-Laborie C., Deniaud J. (2005) « *Cahiers d'habitats* » *Natura 2000. Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 4 - Habitats agropastoraux*. La documentation française, Paris.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, *et al.* (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, **20**, 30-59.

- Bobbink R, Hettelingh JP (2011) *Review and revision of empirical critical loads and dose-response relationships*. RIVM report 680359002, Coordination Centre for Effects, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Noordwijkerhout.
- Botineau M, Descubes-Gouilly C, Ghestem A, Vilks A (1986) Les prairies montagnardes du Limousin ; essai d'appréciation de leur valeur pastorale. *Documents Phytosociologiques*, **10**, 77-95.
- Braun-Blanquet J, (1964) *Pflanzensociologie: Grundzuge der Vegetationskunde*. 3te aufl. Springer-Verlag, Wein. 865 pp.
- Braun-Blanquet J, (1932) *Plant sociology* (Transl. GD Fuller and HS Conrad). Mc Graw-Hill, New-York, 539 pp.
- Britton AJ, Pakeman RJ, Carey PD, Marrs RH (2001) Impacts of climate, management and nitrogen deposition on the dynamics of lowland heathland. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 797-806.
- Caporn SJM, Ashenden TW, Lee JA (2000) The effect of exposure to NO₂ and SO₂ on frost hardiness in *Calluna vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, **43**, 111-119.
- Carroll JA, Caporn SJM, Johnson D, Morecroft MD, Lee JA (2003) The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acid and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **121**, 363-376.
- Chapman HD, Pratt PF (1985) *Methods for Analysis of Soils, Plants and Waters*. Agricultural Sciences Publications, Berkeley, CA.
- Churkina G, Zaehle S, Hughes J *et al.* (2010) Interactions between nitrogen deposition, land cover conversion, and climate change determine the contemporary carbon balance of Europe. *Biogeosciences*, **7**, 2749-2764.
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, *et al.* (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, **437**, 529-533.
- Clark CM, Tilman D (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712-715.
- Clément B (1978) *Contribution à l'étude phytoécologique des Monts d'Arrée; organisation et cartographie des biocénoses, évolution et productivité des landes*. University of Rennes, Rennes.
- Cunha A, Power SA, Ashmore MR, Green PRS, Haworth BJ, Bobbink R (2002) In: *Whole ecosystem nitrogen manipulation: an update review* JNCC, Peterborough.
- Day PR (1965) Particle fractionation and particle-size analysis. In: *Methods of soil analysis* Vol. 1 (ed Black CA), pp. 545-567. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.
- De Foucault B (1993) Nouvelles recherches sur les pelouses de l'*Agrostion curtisii* et leur syndynamique dans l'Ouest et le Centre de la France. *Bulletin de la société botanique du Centre-ouest, Nouvelle série*, **24**, 151-178.
- De Foucault B (1986) Données systémiques sur la végétation prairiale mésophile du pays Basque et des landes de Gascogne. *Documents Phytosociologiques*, **10**, 203-219.

- De Graaf MCC, Bobbink R, Smits NAC, Van Diggelen R, Roelofs JGM (2009) Biodiversity, vegetation gradients and key biogeochemical processes in the heathland landscape. *Biological Conservation*, **142**, 2191-2201.
- Dentener F, Stevenson D, Ellingsen K, *et al.* (2006) The global atmospheric environment for the next generation. *Environmental Science & Technology*, **40**, 3586-3594.
- de Vries W, Solberg S, Dobbertin M, *et al.* (2009) The impact of nitrogen deposition on carbon sequestration by European forests and heathlands. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1814-1823.
- Dufrene M, Legendre P (1997) Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, **67**, 345-366.
- Dullinger S, Dirnböck T; Greimler J, Grabherr G (2003) A resampling approach for evaluating effects of pasture abandonment on subalpine plant species diversity. *Journal of Vegetation Science*, **14**, 243-252.
- Duprè C, Stevens CJ, Ranke T, *et al.* (2010) Changes in species richness and composition in European acid grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344-357.
- Erismann JW, Bleeker A, Galloway J, Sutton MS (2007) Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental Pollution*, **150**, 140-149.
- Erismann JW, Vermeulen A, Hensen A, *et al.* (2005) Monitoring and modelling of biosphere/atmosphere exchange of gases and aerosols in Europe. *Environmental Pollution*, **133**, 403-413.
- Fagerli H, Aas W (2008) Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution*, **154**, 448-461.
- Fagerli H, Simpson D, Tsyro S (2004) Transboundary acidification, eutrophication and ground level ozone in Europe, EMEP Status Report 1/2004. The Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway.
- Falkengren-Grerup U, ten Brink DJ, Brunet J (2006) Land use effects on soil N, P, C and pH persist over 40-80 years of forest growth on agricultural soils. *Forest Ecology and Management*, **225**, 74-81.
- Fowler D, Smith RI, Muller JBA, Hayman G, Vincent KJ (2005) Changes in the atmospheric deposition of acidifying compounds in the UK between 1986 and 2001. *Environmental Pollution*, **137**, 15-25.
- Fowler D, Flechard C, Skiba U, Coyle M, Cape JN (1998) The atmospheric budget of oxidized nitrogen and its role in ozone formation and deposition. *New Phytologist*, **139**, 11-23.
- Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, *et al.* (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889-892.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, *et al.* (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, **70**, 153-226.
- Galloway JN (1998) The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental Pollution*, **102**, 15-24.

- Gilbert JC, Gowing DJG, Loveland P (2003) Chemical amelioration of high phosphorus availability in soil to aid the restoration of species-rich grassland. *Ecological Engineering*, **19**, 297-304.
- Grabherr G, Gottfried M, Pauli H (1994) Climate effect on mountain plants. *Nature*, **369**, 448.
- Grime JP, Fridley JD, Askew AP, Thompson K, Hodgson JG, Bennett CR (2008) Long-term resistance to simulated climate change in an infertile grassland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10028-10032.
- Haines-Young R, Barr CJ, Firbank LG, *et al.* (2003) Changing landscapes, habitats and vegetation diversity across Great Britain. *Journal of Environmental Management*, **67**, 267-281.
- Hannah L, Midgley GF, Lovejoy T, *et al.* (2002) Conservation of biodiversity in a changing climate. *Conservation Biology*, **16**, 264-268.
- Hanski I, Kouki J, Halkka A (1993) Three explanations of the positive relationship between distribution and abundance of species. In: *Community Diversity: Historical and Geographical Perspectives* (eds Ricklefs RE, Schluter D), pp. 108-116. Chicago University Press, Chicago.
- Hartley SE, Mitchell RJ (2005) Manipulation of nutrients and grazing levels on heather moorland: changes in *Calluna* dominance and consequences for community composition. *Journal of Ecology*, **93**, 990-1004.
- Hautier Y, Niklaus PA, Hector A (2009) Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, **324**, 636-638.
- Haveman R, Janssen, JAM (2008) The analysis of long-term changes in plant communities using large databases: The effect of stratified resampling. *Journal of Vegetation Science*, **19**, 355-362.
- Horswill P, O'Sullivan O, Phoenix GK, Lee JA, Leake JR (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **155**, 336-349.
- IPCC (2007) Climate change and its impacts in the near and long term under different scenarios. In: *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (ed Core Writing Team Pachauri, R.K and Reisinger, A.), pp. 104. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Kleijn D, Bekker RM, Bobbink R, De Graaf MCC, Roelofs JGM (2008) In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 680-687.
- Lenoir J, Gegout JC, Marquet PA, de Ruffray P, Brisse H (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science*, **320**, 1768-1771.
- Lovett GM, Tear TH, Evers DC, *et al.* (2009) Effects of Air Pollution on Ecosystems and Biological Diversity in the Eastern United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1162**, 99-135.

- MAFF (1986) *The analysis of Agricultural Materials, Third Edition ed.* Her Majesty's Stationary Office, London.
- Magnani F, Mencuccini M, Borghetti M, *et al.* (2007) The human footprint in the carbon cycle of temperate and boreal forests. *Nature*, **447**, 848-852.
- Majdi H, Ohrvik J (2004) Interactive effects of soil warming and fertilization on root production, mortality, and longevity in a Norway spruce stand in Northern Sweden. *Global Change Biology*, **10**, 182-188.
- Maskell LC, Smart SM, Bullock JM, Thompson K, Stevens CJ (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671-679.
- McGovern S, Evans CD, Dennis P, Walmsley C, McDonald MA (2011) Identifying drivers of species compositional change in a semi-natural upland grassland over a 40-year period. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 346-356.
- Moberg A, Sonechkin DM, Holmgren K, Datsenko NM, Karlen W (2005) Highly variable Northern Hemisphere temperatures reconstructed from low- and high-resolution proxy data. *Nature*, **433**, 613-617.
- Muller S (1986) *La végétation du pays de Bitche (Vosges du Nord) Analyse phytosociologique Application à l'étude synchronique des successions végétales.* University of Paris-Sud, Paris.
- NEG-TAP (2001) In: *Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK.* CEH, Edinburgh.
- Osborn TJ, Briffa KR (2006) The spatial extent of 20th-century warmth in the context of the past 1200 years. *Science*, **311**, 841-844.
- Pan YD, Birdsey R, Hom J, McCullough K (2009) Separating effects of changes in atmospheric composition, climate and land-use on carbon sequestration of US Mid-Atlantic temperate forests. *Forest Ecology and Management*, **259**, 151-164.
- Papanikolaou N, Britton AJ, Helliwell RC, Johnson D (2010) Nitrogen deposition, vegetation burning and climate warming act independently on microbial community structure and enzyme activity associated with decomposing litter in low-alpine heath. *Global Change Biology*, **16**, 3120-3132.
- Pearson J, Stewart GR (1993) Tansley Review No. 56: The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, **125**, 283-305.
- Peñuelas J, Prieto P, Beier C, *et al.* (2007) Response of plant species richness and primary productivity in shrublands along a north-south gradient in Europe to seven years of experimental warming and drought: reductions in primary productivity in the heat and drought year of 2003. *Global Change Biology*, **13**, 2563-2581.
- Phoenix GK, Hicks WK, Cinderby S, *et al.* (2006) Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, **12**, 470-476.

- Pilkington MG, Caporn S, Carroll JA, *et al.* (2005) Effects of increased deposition of atmospheric nitrogen on an upland moor: leaching of N species and soil solution chemistry. *Environmental Pollution*, **135**, 29-40.
- Press MC, Phoenix GK (2005) Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist*, **166**, 737-751.
- Rich, T, Redbane, M, Fasham, M, McMeechan, F, Dobson, D (2005) Ground and shrub vegetation. In D. Hill, M. Fasham, G. Tucker, M. Shewry, and P. Shaw, (eds.), *Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring* pp. 201-222 Cambridge University press, Cambridge.
- Rivas-Goday S, Rivas-Martinez S (1963) Estudio y clasificacion de los pastizales espanoles. *Publication Ministerio de agricultura*, **277**, 269.
- Ryan J, Estefan G, Rashid A (2001) *Soil and Plant Analysis Laboratory Manual, Second Edition*. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, *et al.* (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770-1774.
- Schwickerath M (1944) Das hohe Venn und seine Randgebiete: Vegetation, Boden, und Landschaft. *Pflanzensoziologie*, **6**, 1-278.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2010) *Global Biodiversity Outlook 3*. Montréal, 94 pp.
- Serveau L, Allemand N, André JM *et al.* (2010) Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France - Séries sectorielles et analyses étendues. Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), Paris.
- Sheppard LJ, Leith ID (2002) Effects of NH₃ fumigation on the frost hardiness of Calluna - Does N deposition increase winter damage by frost? *Phyton-Annales Rei Botanicae*, **42**, 183-190.
- Simpson D, Fagerli H, Jonson JE, Tsyro S, Wind P, Tuovinen J-P (2003) Transboundary acidification and eutrophication and ground level ozone in Europe: Unified EMEP Model Description, EMEP Status Report 1/2003 Part I, EMEP/MS-CW Report. The Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway.
- Smith RS, Shiel RS, Millward D, Corkhill P, Sanderson RA (2002) Soil seed banks and the effects of meadow management on vegetation change in a 10-year meadow field trial. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 279-293.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution*, **158**, 2940-2945.
- Stevens CJ, Duprè C, Gaudnik C, *et al.* (2011a) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207-215.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2011b) The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution*, doi:10.1016/j.envpol.2010.11.026.

- Stevens CJ, Dise NB, Gowing DJ, Mountford JO (2006) Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology*, **12**, 1823-1833.
- Stevens CJ, Dise NB, Mountford JO, Gowing DJ (2004) Impact of Nitrogen Deposition on the Species Richness of Grasslands. *Science*, **303**, 1876-1879.
- Stieperaere H (1990) *De heischrale graslanden (Nardetea) van atlantisch Europa*. Univ. Gent, 325 pp.
- Sutton MA, Place CJ, Eager M, Fowler D, Smith RI (1995) Assessment of the magnitude of ammonia emissions in the United-Kingdom. *Atmospheric Environment*, **29**, 1393-1411.
- Throop HL, Holland EA, Parton WJ, Ojima DS, Keough CA (2004) Effects of nitrogen deposition and insect herbivory on patterns of ecosystem-level carbon and nitrogen dynamics: results from the CENTURY model. *Global Change Biology*, **10**, 1092-1105.
- Tomassen HBM, Smolders AJP, Lamers LPM, Roelofs JGM (2003) Stimulated growth of *Betula pubescens* and *Molinia caerulea* on ombrotrophic bogs: role of high levels of atmospheric nitrogen deposition. *Journal of Ecology*, **91**, 357-370.
- Tomassen H, Bobbink R, Peters R, Van der Ven P, Roelofs J (1999) Kritische stikstofdepositie in heischrale graslanden, droge duingraslanden en hoogvenen: op weg naar meer zekerheid. Eindrapport in het kader van het Stikstof Onderzoek Programma (STOP). Katholieke Universiteit Nijmegen en Universiteit Utrecht, Nijmegen and Utrecht, the Netherlands.
- Turner MM, Henry HAL (2009) Interactive effects of warming and increased nitrogen deposition on ¹⁵N tracer retention in a temperate old field: seasonal trends. *Global Change Biology*, **15**, 2885-2893.
- van den Berg LJL, Dorland E, Vergeer P, Hart MAC, Bobbink R, Roelofs JGM (2005) Decline of acid-sensitive plant species in heathland can be attributed to ammonium toxicity in combination with low pH. *New Phytologist*, **166**, 551-564.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, *et al.* (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications*, **7**, 737-750.
- Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry*, **13**, 87-115.
- Wamelink GWW, van Dobben HF, Berendse F (2009) Vegetation succession as affected by decreasing nitrogen deposition, soil characteristics and site management: A modelling approach. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1762-1773.
- Wedin D, Tilman D (1993) Competition among grasses along a nitrogen gradient: initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs*, **63**, 199-229.
- Zavaleta ES, Shaw MR, Chiariello NR, Mooney HA, Field CB (2003) Additive effects of simulated climate changes, elevated CO₂, and nitrogen deposition on grassland diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7650-7654.

European Mapping and Emissions Programme (EMEP) available at: www.emep.int. This site contains yearly model results of nitrogen deposition for the whole EMEP grid for the years 1980, 1985 and 1990-2007.



Végétation du site expérimental mis en place à Léognan (33) caractérisant une prairie acide appartenant à l'alliance de l'Agrostion curtisii (De Foucault, 1986), vicariante du Violion caninae.

CHAPITRE 3

APPORTS EXPERIMENTAUX D'AZOTE SUR LES PRAIRIES ACIDES :

EFFETS DE LA QUANTITE ET DE LA FORME D'AZOTE,
REMEDIACTION PAR LA FAUCHE

Résumé

La compréhension de l'impact des dépôts d'azote atmosphérique sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes nécessite la mise en évidence de mécanismes via une approche expérimentale. Au sein d'une prairie acide, nous avons examiné les effets de l'application régulière d'azote totale (0, 35 et 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) combinée à une ou deux coupes par an, ainsi que l'effet de la forme d'azote en appliquant régulièrement des formes oxydées ou réduites d'azote à des doses de 70 kg N ha⁻¹an⁻¹.

Après une période d'expérimentation de quatre ans, aucune réponse globale de la végétation aérienne n'a été perçue suite à l'application d'azote totale. De même, l'interaction entre l'azote total et la coupe n'a montré aucun effet sur la structure de la végétation aérienne. L'absence de réponse significative de la végétation, avec même une tendance à une diminution de biomasse au cours de l'expérimentation, suggère que des mécanismes tels que la faible rétention en azote du système ou la limitation par une autre ressource seraient prépondérants dans notre système d'étude. Dans ces habitats acides, l'apport d'azote n'entraînerait donc pas de compétition pour la lumière, au sein de la végétation. Cependant, en conditions peu fertiles et avec une faible perturbation, la compétition pour les ressources du sol pourrait jouer un rôle.

Au contraire, la forme d'azote a montré des effets marqués sur la végétation et le sol. L'application d'azote réduit a provoqué une diminution notable de la biomasse de graminoides et de la richesse spécifique, en cohérence avec l'hypothèse de toxicité de l'azote réduit. Ces effets de l'azote réduit sont dus à une faible nitrification alors que le pH ne montre pas encore de modification. Nos résultats indiquent qu'il est nécessaire de tenir compte de la forme d'azote, notamment en prairie acide, afin d'envisager des mesures de restauration cohérentes avec l'accumulation d'ammonium dans ces systèmes acides.

Introduction

Les effets de l'apport azoté sur la structure et le fonctionnement des communautés végétales s'expriment de manière quantitative par la limitation de la production selon la disponibilité en azote dans les écosystèmes terrestres tempérés (Vitousek & Howarth, 1991), dans un contexte d'augmentation globale des dépôts d'azote dans les écosystèmes par les activités anthropiques (Galloway *et al.*, 2008). Au niveau qualitatif, un changement récent de composition des dépôts d'azote dans la plupart des pays européens peut être observé, avec une diminution globale des dépôts oxydés et un maintien des dépôts réduits (Fagerli & Aas, 2008).

Les travaux dédiés à la compréhension de l'impact de l'enrichissement en azote sur les écosystèmes a abouti à des questions non résolues, à la fois sur l'aspect théorique et appliqué (Sutherland *et al.*, 2006). La relation gaussienne théorique existant entre la richesse spécifique et la productivité (Grime, 1979) ne concorde pas toujours avec certaines observations le long de gradients naturels qui dépendent souvent de l'échelle d'étude (Hector *et al.*, 1999 ; Gross *et al.*, 2000 ; Mittelbach *et al.*, 2001). D'autre part, il reste essentiel de définir le rôle des facteurs biotiques et abiotiques agissant sur la cascade d'azote, à la fois au niveau de la végétation et du sol. De nombreuses méthodes sont appliquées pour estimer la réponse des écosystèmes aux dépôts d'azote atmosphérique. Ainsi, le suivi des espèces ou des écosystèmes, dans le temps ou le long d'un gradient de dépôts azotés, peut fournir des informations utiles (Duprè *et al.*, 2010 ; Gaudnik *et al.*, 2011 ; Stevens *et al.*, 2010, 2011a, 2011b). Cependant, la complexité du cycle de l'azote rend difficile la détermination précise des réponses aux dépôts azotés croissants à partir de cette méthode. La mise en évidence des interactions végétales et des processus à l'interface plante-sol nécessite donc une démarche expérimentale soit en conditions contrôlées en laboratoire (Johnson *et al.*, 1999 ; Vergeer *et al.*, 2008 ; St Clair *et al.*, 2009), soit directement sur le terrain. Les expérimentations en laboratoire apportent des informations importantes bien qu'il s'agisse en général d'études à court-terme. Par conséquent, la manipulation au sein de l'écosystème reste la méthode la plus appropriée pour étudier la réponse aux dépôts azotés, en déterminant des relations de cause à effet. De plus, il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation de terrain pour appréhender les changements à l'échelle temporelle, puisque les écosystèmes peuvent répondre lentement aux changements ou contraintes environnementales (Clark *et al.*, 2009). Cet effet temporel varie entre des changements rapides de la composition de la communauté, suite à des modifications de la performance d'une espèce (Bobbink & Willems, 1991), et des changements progressifs, par exemple dans les propriétés physico-chimiques du sol (Blake *et al.*, 1999). Il est donc important de prendre en compte les futurs changements à long-terme de l'écosystème dans l'extrapolation des expérimentations relativement courtes. Les études expérimentales disponibles se sont essentiellement appuyées sur des expériences d'apport global de nutriments (NPK) (Tilman, 1984 ; Vermeer, 1986 ; Bobbink, 1991), ou bien, lorsque seul l'apport d'azote a été considéré, ont consisté à appliquer des fortes quantités d'azote, non

réalistes des valeurs de dépôts azotés, en considérant uniquement l'azote sous forme totale (Morecroft *et al.*, 1994 ; Carroll *et al.*, 2003 ; Pilkington *et al.*, 2005). Récemment, des efforts ont été réalisés pour considérer à la fois des doses réalistes d'azote (Clark & Tilman, 2008 ; Plassmann *et al.*, 2009) et séparer les différents nutriments, N, P et K, (Hartley & Mitchell, 2005 ; Arroniz-Crespo *et al.*, 2008). Néanmoins, la non distinction de la forme d'azote, dans le contexte actuel des dépôts d'azote, pourrait induire des biais dans la compréhension des réponses de l'écosystème à ces dépôts d'azote (Stevens *et al.*, 2011c).

Les études comparatives entre et au sein des écosystèmes montrent des patrons globaux, qui supportent de larges variations dans la réponse à l'enrichissement en azote (Bobbink *et al.*, 2010). Par exemple, bien que l'addition d'azote dans des prairies calcaires aux Pays-Bas ait drastiquement réduit la richesse spécifique (Bobbink *et al.*, 1991), des expériences similaires dans des prairies calcaires et acides au Royaume-Uni ont montré en comparaison très peu de changements (Wilson *et al.*, 1995 ; Carroll *et al.*, 2003). Le fait que certaines communautés répondent fortement à l'apport azoté, et d'autres non, s'explique par de nombreux facteurs qui influencent la réponse des écosystèmes tels que la quantité d'azote, le type et la forme d'azote, la sensibilité inhérente au système et les interactions avec l'environnement et la gestion du milieu. Ainsi, des différences dans les conditions du milieu se traduisent par des variations dans la réponse de l'écosystème à l'enrichissement en azote. L'impact maximal de cet enrichissement sur l'écosystème est alors attendu lorsque (i) le principal nutriment limitant est l'azote (Vitousek & Howarth, 1991), (ii) les taux de production et la disponibilité en azote sont faibles (Chapin *et al.*, 1986), (iii) le potentiel d'acidification du sol par l'azote est grand (Roem *et al.*, 2002 ; Horswill *et al.*, 2008 ; Maskell *et al.*, 2010), (iv) de nombreuses espèces ou groupes fonctionnels sensibles aux apports azotés sont présents (Suding *et al.*, 2005 ; Van den Berg *et al.*, 2005 ; Kleijn *et al.*, 2008) et (v) la prédisposition aux facteurs secondaires de stress est forte (Power *et al.*, 1998). Dans cette étude, les hypothèses soutenues sont les suivantes : (H1) les espèces graminoides de haute stature bénéficient de l'augmentation de la disponibilité en azote tandis que les plantes de petite stature déclinent (Stevens *et al.*, 2006) ; (H2) l'ombrage direct par le couvert dense de graminoides, principalement des espèces compétitrices, induit un déplacement d'une compétition souterraine, pour les ressources du sol, vers une compétition aérienne, pour la lumière, décrit comme la principale cause du déclin de la biodiversité (Hautier *et al.*, 2009) ; (H3) des fauches plus fréquentes avec exportation de la biomasse aérienne permettent de réduire la disponibilité en azote et ainsi prévenir la dominance des graminoides (Wamelink *et al.*, 2009) et (H4) l'effet négatif de l'azote réduit est plus important que l'effet de l'azote oxydé, à travers des effets toxiques d'accumulation dans le sol de NH_4^+ , provoquant un développement réduit des espèces sensibles ou des effets d'acidification (van den Berg *et al.*, 2008).

Afin de tester la contribution de ces différentes hypothèses dans les mécanismes mis en jeu lors de l'apport d'azote, une expérimentation d'addition d'azote a été mise en place.

L'expérimentation comprend une première partie où des quantités croissantes d'azote total sont combinées avec deux fréquences de coupe, dans le but de tester la dose d'azote et le régime de fauche comme moyen de remédiation des milieux. La seconde partie de l'expérimentation vise à distinguer les effets de la forme d'azote, entre azote total, oxydé et réduit, pour une quantité d'azote donnée. Les questions de recherche abordées dans cette étude sont les suivantes :

1. Quel est l'effet de l'addition croissante d'azote sur les prairies acides, notamment sur la richesse spécifique ?
2. Quelle est l'importance de la compétition pour la lumière pour expliquer une potentielle perte de diversité suite à l'addition d'azote ?
3. Est-ce que l'exportation de biomasse via des fauches répétées contrebalance les effets négatifs potentiels des apports d'azote ?
4. Quels sont les effets distincts entre l'azote réduit et l'azote oxydé ?

Matériel et méthodes

Site d'étude

L'expérimentation a été menée, dès 2007, au sein d'une prairie acide située à proximité de Bordeaux, en bordure de l'aérodrome de Bordeaux-Mérignac (44°42'N, 0°35'O, 53 m d'altitude). Cette expérimentation a été menée simultanément au Royaume-Uni et en Norvège dans le cadre du programme BEGIN selon le protocole établi à l'échelle européenne (Dorland *et al.*, 2009). Ainsi, pour sélectionner le site, la présence de cinq espèces végétales caractéristiques parmi la liste suivante a été jugée indispensable : *Agrostis capillaris* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Campanula rotundifolia* L., *Carex pilulifera* L., *Danthonia decumbens* (L.) DC., *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., *Festuca rubra* L./*ovina* L., *Galium saxatile* L., *Luzula campestris* (L.) DC., *Nardus stricta* L., *Polygala spp.* L., *Potentilla erecta* (L.) Rauschel et *Rhytidadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst (Figure 3.1). Le choix du site a été également contraint par une surface minimale pour accueillir l'ensemble du dispositif expérimental, un éloignement vis-à-vis des voies de passages trop fréquentées et une végétation maintenue sur le site par une fauche annuelle entre avril et septembre. Les sites, présentant de larges zones de *Juncus sp.* et un développement important d'espèces ligneuses, ont été évités puisqu'ils traduisent soit des conditions hydriques non satisfaisantes, soit un abandon de la gestion du site. De plus, un soin particulier a été porté sur la sélection de la zone d'expérimentation pour minimiser autant que possible les variations entre et au sein des blocs expérimentaux. Ainsi, la prairie ciblée a été identifiée comme l'alliance de l'*Agrostion curtisii* (De Foucault, 1986), vicariante du *Violion caninae* (Schwickerath, 1944), appartenant à la classe *Nardetea strictae* (Rivas-Goday & Rivas-Martinez, 1963). Ce type de prairies représente l'habitat 6230 Natura 2000, classification typologique EUNIS 1.72 (Davies *et al.*, 2004), prioritaire pour l'Union Européenne (Bensettiti *et al.*, 2005). Le site est dominé par des espèces végétales de Poacées telles qu'*Agrostis capillaris*, *Agrostis curtisii*, *Danthonia*

decumbens et *Pseudarrhenatherum longifolium*, de Fabacées telles que *Ulex europaeus* et *Ulex minor* et de dicotylédones telles que *Calluna vulgaris*, *Erica spp.*, *Polygala spp.*, *Potentilla erecta* et *Viola canina* (Figure 3.1).



Figure 3.1. Photographies des espèces caractéristiques des prairies acides nécessaires à la sélection du site expérimental et des espèces dominantes du site appartenant aux prairies de l'*Agrostion curtisii*.

Ce type de prairie se distingue par un sol acide, avec un pH situé entre 4,5 et 5,5 dans les 10 premiers centimètres du sol, et également pauvre en humus, en nutriments et en cations échangeables. La nature du sol, de type podzol, provient de dépôts alluviaux de sables et de graviers sur une roche mère calcaire. Le climat de type océanique est caractérisé par de faibles amplitudes de températures, avec des hivers doux et pluvieux et des étés frais et relativement humides (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Descriptions des variables climatiques du site pendant la période d'expérimentation. La température moyenne, les précipitations (P), l'évapotranspiration potentielle (ETP) et P-PET, qui traduit la disponibilité en eau du sol, ont été obtenues en moyennant les données pour chaque année sur la période de végétation, de mars à juin, à partir de la station météorologique la plus proche du site, située à une dizaine de kilomètres (Agroclim INRA, Cestas : 44,7°N/-0,78°O).

Année	Température (°C)	Précipitations (mm)	ETP (mm)	P-E TP (mm)
2007	14,3 (±1,9)	319,5 (±23,7)	337,2 (±63,3)	-17,7 (±12,5)
2008	13,4 (±2,1)	382,4 (±21,9)	333,0 (±74,3)	49,4 (±15,3)
2009	13,9 (±2,3)	293,5 (±16,1)	366,8 (±75,3)	-73,3 (±13,2)
2010	13,4 (±2,0)	201,0 (±8,8)	349,6 (±66,1)	-148,6 (±12,1)

Afin d'interpréter correctement les réponses de l'écosystème aux apports d'azote, les dépôts atmosphériques ont été évalués à l'aide de modèles et de mesures effectuées sur le site expérimental. Pour représenter les dépôts d'azote lors de l'expérimentation, les données modélisées ont été moyennées sur la période 2004-2006 (EMEP, 2008), en distinguant les dépôts d'azote oxydé et réduit (Tableau 3.2). Pour les mesures de dépôts d'azote du site, les dépôts totaux ont été collectés à l'aide d'un entonnoir conique, équipé d'une grille filtrante et fixé sur un flacon récepteur de 5 L. Ce dispositif, placé à 1,50 m de hauteur, a été répliqué trois fois dans le site. L'échantillonnage a été effectué de janvier à juin 2010, en collectant les échantillons après une exposition d'un mois, conseillée lors de faibles dépôts. Les dépôts humides ont été collectés directement par le flacon et les dépôts secs en rinçant l'entonnoir avec de l'eau déionisée. Les échantillons frais ont été rapidement analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), pour obtenir la concentration (mg L^{-1}) en nitrate (NO_3^-) et en ammonium (NH_4^+). Les concentrations, moyennées en éliminant la valeur de réplikat la plus extrême, ont été exprimées en dépôts par la formule suivante, pour s'affranchir des problèmes de dilution :

$$\text{Flux}_x = (C_x \times M_{\text{éch}}) / (S \times D)$$

- Flux_x est le dépôt de l'élément X en $\text{kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$
- C_x est la concentration de l'élément X en $\mu\text{g L}^{-1}$
- $M_{\text{éch}}$ est la masse de l'échantillon collecté en kg
- S est la surface du collecteur : πR^2 , avec $R=0,001 \text{ hm}$
- D est la durée d'exposition rapportée à une année

Tableau 3.2. Dépôts d'azote réduit, oxydé et total, comprenant les dépôts secs et humides (les erreurs standard sont indiquées entre parenthèses). Les dépôts modélisés ont été obtenus en moyennant les valeurs de 2004 à 2006 de la maille 50 x 50 km du modèle EMEP couvrant le site expérimental. Les dépôts mesurés, obtenus à partir d'échantillons collectés sur le site, ont été analysés par HPLC, en moyennant les échantillons mensuels de janvier à juin 2010.

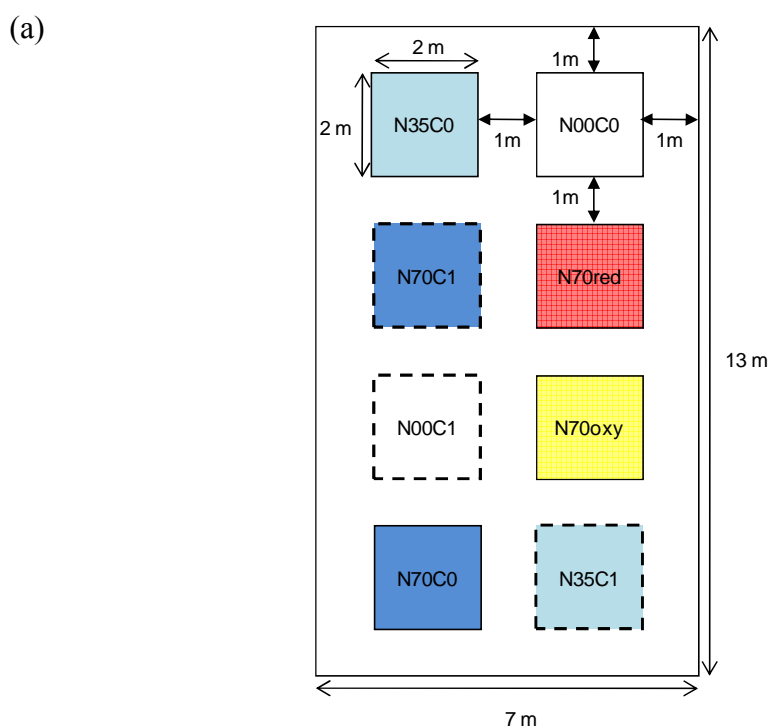
	Modèle EMEP (kg N ha ⁻¹ an ⁻¹)	Mesures terrain (kg N ha ⁻¹ an ⁻¹)
Dépôts N réduit	4,44 (± 0,05)	2,25 (± 0,94)
Dépôts N oxydé	4,51 (± 0,47)	3,11 (± 1,14)
Dépôts N total	8,95 (± 0,52)	5,36 (± 2,08)

Les dépôts de nitrate et d'ammonium ont été exprimés en masse d'azote en considérant respectivement le rapport soit de la masse moléculaire de NO₃⁻ (soit 62,01), soit de la masse moléculaire de NH₄⁺ (soit 18,01), avec la masse atomique de N (soit 14,01). Les valeurs de dépôts ont situé le site dans une zone recevant une faible gamme de dépôts (Tableau 3.2). Les dépôts mesurés ont été corroborés par les valeurs du modèle EMEP, en soulignant la présence du site dans une zone très peu impactée par les dépôts d'azote, avec des valeurs réelles autour de 5 kg N ha⁻¹ an⁻¹. La proximité immédiate avec l'aérodrome n'est donc pas problématique en termes de dépôts, qui se maintiennent à des valeurs en deçà de la gamme des charges critiques et restent largement inférieures aux doses appliquées lors de l'expérimentation. De plus, les dépôts sont représentés équitablement sous forme réduite et oxydée avec toutefois une prédominance des dépôts secs par rapport aux dépôts humides (données non montrées).

Traitements expérimentaux

Une quantité croissante d'azote, sous forme totale de NH₄NO₃, a été appliquée en trois traitements, selon le protocole établi à l'échelle européenne (Dorland *et al.*, 2009): aucun apport d'azote, servant de témoin (**N00**), apport modéré d'azote (**N35** : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹) et fort apport d'azote (**N70** : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹). Pour ce dernier traitement, une distinction a été faite selon la forme d'azote : apport d'azote réduit (**N70red** : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹ sous forme de NH₄Cl) ou d'azote oxydé (**N70oxy** : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹ sous forme de NaNO₃). Chaque traitement a été appliqué, dans des quadrats de 2×2 m, sous forme dissoute avec de l'eau déionisée en pulvérisant 4 L du mélange par quadrat, réparti sur l'année en huit occasions d'avril à novembre (Figure 3.2). Les quadrats témoin (N00) ont reçu un volume d'eau déionisée équivalent aux autres traitements. L'expérimentation tentant de simuler une augmentation des dépôts azotés, les traitements azotés n'ont pas été appliqués durant la période hivernale où les pertes d'azote par lixiviation sont maximales à cause de la forte pluviométrie et de la faible rétention en eau du sol, composé majoritairement de sable. Les traitements N00, N35 et N70 ont été combinés factoriellement avec deux traitements de coupe, soit une coupe estivale traditionnelle servant de contrôle (**C0**) et deux coupes, une traditionnelle en été et une coupe supplémentaire en automne (**C1**). Le traitement C0

correspond au traitement témoin puisque le site été géré avant l'expérimentation par une coupe annuelle entre mai et juillet au gyrobroyeur.



(b)



Figure 3.2. (a) Schéma expérimental représentant un bloc contenant les 8 traitements répartis dans des quadrats de 2x2 m. Chaque traitement est symbolisé par une couleur et un contour : N total témoin (N00 : blanc), N total modéré (N35 : bleu clair), N total élevé (N70 : bleu foncé), N oxydé élevé (N70oxy : jaune) et N réduit élevé (N70red : rouge) et la coupe C0 (trait plein) et C1 (trait en pointillé) ; (b) photographie du site expérimental où a été appliqué le schéma expérimental avec la mise en place des quadrats de 2x2 m.

Chaque année, la coupe estivale a été réalisée après la récolte de biomasse début juillet tandis que la deuxième coupe, réalisée dans certains quadrats, a été mise en place fin novembre voire début décembre. Le traitement « coupe » a été accompagné d'une exportation de la biomasse fauchée afin de diminuer la disponibilité en azote. L'expérimentation comprend donc au total 8 traitements, appliqués sur des quadrats de 2×2 m répartis dans chacun des blocs du site (Figure 3.2). Chaque bloc a été répliqué cinq fois avec une zone tampon de 2 m minimum entre les blocs.

Échantillonnage et mesures de la végétation

Avant toute autre mesure annuelle de la végétation, des profils de lumière ont été réalisés au niveau du sol, en couvrant l'ensemble du quadrat, en février, juin et septembre 2009. Les mesures ont été réalisées lors de journées dégagées afin d'estimer la transmission du rayonnement solaire sous le couvert végétal et donc l'atténuation de lumière par la végétation. Les mesures ont été effectuées systématiquement tous les 10 cm, sur deux côtés opposés de chaque quadrat, afin de quadriller chaque quadrat et d'obtenir une moyenne globale d'atténuation par quadrat. L'ensemble des mesures a été réalisé à l'aide d'un analyseur de couvert végétal Sunscan (Delta-T Devices, Royaume-Uni), comprenant une sonde d'un mètre pourvue de capteurs photodiodes, qui déterminent les rayonnements incidents et transmis dans la fraction du PAR (Rayonnement Photosynthétique Actif). Durant les mesures, un capteur externe a collecté les valeurs de rayonnement hors du couvert végétal, servant de valeur de référence.

La structure de la végétation a également été quantifiée par la hauteur et la densité de végétation dans trois blocs du site. Afin de suivre la dynamique de la végétation, ces mesures ont été effectuées durant toute la période végétative de mai à juillet 2010, lors de quatre campagnes espacées de deux semaines chacune. Durant cette période, la hauteur de végétation a été mesurée au sein des quadrats, en cinq points fixes, en considérant l'appareil végétatif et les inflorescences. La densité de végétation a été estimée par la méthode du point contact, mesurée tous les 10 cm le long d'une diagonale de chaque quadrat et rapportée à un pourcentage de points contacts.

Avant de procéder à l'échantillonnage estival de la biomasse, la composition de la végétation de chaque quadrat a été identifiée en termes d'espèces, incluant les bryophytes et les lichens. Pour chaque espèce, un pourcentage de couvert au sol a été estimé à l'aide de l'échelle de « Domin » qui distingue 10 classes de couvert végétal (Rich *et al.*, 2005).

L'échantillonnage de la biomasse a été effectué une semaine après l'anthèse d'*Agrostis capillaris*, commençant fin juin voire début juillet selon les années. La biomasse a été récoltée dans un sous-échantillon de 50×50 cm au sein de chaque quadrat. L'emplacement de ce sous-échantillon, fixé sur toute la période d'expérimentation, a été choisi afin d'être le plus représentatif de la végétation du quadrat. Cet objectif a été rendu difficile par la présence

sur le site d'espèces telles qu'*Erica spp.* et *Ulex spp.*, se développant en taches dans la végétation. La biomasse aérienne a été coupée à 3 cm de hauteur, puis triée en quatre groupes fonctionnels : les Cypéracées, les Graminoïdes, les Fabacées et la végétation restante regroupée sous les dicotylédones. La hauteur de coupe n'a pas permis de considérer les bryophytes et d'échantillonner complètement les plantes sous forme de rosette au sol. Les échantillons ont été ensuite séchés à 55°C pendant 72 heures avant d'être pesés. Par la suite, l'ensemble du site a été entièrement fauché en exportant la biomasse afin d'éviter des effets de fertilisation de la litière par le recyclage des éléments contenus dans la végétation. Pour les quadrats soumis au traitement C1, une seconde coupe a été effectuée en automne, entre fin novembre et début décembre, suivi à nouveau du tri, du séchage et de la pesée de la biomasse aérienne. En raison de l'absence de données de biomasse automnale en 2007 et des faibles biomasses récoltées par la suite lors du traitement C1 (en moyenne 17 % et 24% de la biomasse estivale respective de 2008 et 2009), seules les biomasses estivales ont été considérées dans cette étude.

Afin d'analyser le contenu en éléments chimiques de la végétation, les échantillons secs de biomasse ont été broyés en une poudre fine (<2 mm) puis réunis et homogénéisés pour chaque quadrat. Le contenu en carbone et azote total a été mesuré, à l'aide d'un auto-analyseur, pour les échantillons récoltés en 2007 (CN analyser Elementar Model, Stock port, UK) et en 2010 (CHONS analyser Flash 1112 series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Le contenu en phosphore a été également déterminé par une méthode de combustion sèche (Chapman & Pratt, 1985 ; Ryan *et al.*, 2001), suivie d'une méthode colorimétrique par le complexe de Barton (MAFF, 1986). De plus, les échantillons récoltés en 2010 ont été analysés afin de connaître le contenu de certains macro- (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) et micro-éléments (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) à l'aide d'une méthode physique de torche à plasma, l'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry), permettant de doser les éléments simultanément, exprimés en pourcentage de poids secs ou en g kg^{-1} .

Dans un carré de 1×1 m au centre de chaque quadrat, trois échantillons de sol ont été prélevés aléatoirement à l'aide de carottiers métalliques, de 7 cm de diamètre et 10 cm de hauteur. Les échantillons ont été délicatement lavés à l'eau déionisée et tamisés avec un maillage successif de 1 et 0,2 mm afin d'isoler les racines. La biomasse racinaire fraîche a été pesée, scannée et analysée à l'aide d'un logiciel (WinRHIZO) afin d'obtenir les valeurs de surface, de longueur et de diamètre racinaire. Les échantillons ont alors été séchés à 55°C pendant 72 heures avant d'être pesés et broyés en une poudre fine (<2mm). Le contenu en carbone et azote total a été mesuré à l'aide d'un analyseur élémentaire (CHONS analyser Flash 1112 series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Chaque variable a été moyennée à partir des trois répliqués de chaque quadrat.

Échantillonnage et mesure du sol

Pour étudier les conditions du sol au début et à la fin de l'expérimentation, deux échantillons de sol (0-10 cm) ont été prélevés, en 2007 et en 2010, à l'aide d'une tarière de 3 cm de diamètre dans deux coins opposés de chaque quadrat puis homogénéisés en retirant les racines et les cailloux.

Le pH du sol a été déterminé en 2007 et 2010. Après avoir mélangé 5 g de sol et 25 mL d'eau déionisée pendant quelques minutes par agitation magnétique, la mesure a été effectuée une minute après arrêt de l'agitation, calculée comme le temps nécessaire pour obtenir un pH stable (pH/Ion 510 pH meter, Eutech Instruments, Nijkerk, the Netherlands). Les échantillons de sol, récoltés en 2007, ont été séchés à température ambiante et broyés en une poudre fine (<1 mm) pour mesurer le contenu en carbone et azote total à l'aide d'un auto-analyseur (CN analyser Elementar Model, Stock port, UK). Le contenu en phosphore disponible a été déterminé par la méthode d'extraction d'Olsen suivie d'une méthode colorimétrique. Pour les mesures d'ions échangeables (NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-}), les extractions d'échantillons de sol, par une solution à 0,4M NaCl, ont été analysées de manière colorimétrique par un auto-analyseur. En 2007, les concentrations en éléments (Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} , Si^{2+} , Zn^{2+}) ont été analysées par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry). Les échantillons ont été exprimés en pourcentage de poids sec ou en mg kg^{-1} . De plus, les ressources du sol, en NO_3^- et NH_4^+ , ont été mesurées, en 2009, au sein de chaque quadrat à l'aide de sondes PRS (Plant Root Simulator) (Wester AG, Canada). Chaque quadrat a été équipé de deux sondes, une mesurant les échanges de cations (NH_4^+) et une autre mesurant les échanges d'anions (NO_3^-). Les sondes ont été maintenues dans le sol pendant huit semaines, de mai à juillet, puis récupérées et lavées à l'eau déionisée avant d'être analysées par une élution à l'acide chlorhydrique. Les mesures en NO_3^- et NH_4^+ ont été données en $\mu\text{g cm}^{-2} \text{cm}^{-1}$ de profondeur.

Analyses des données

Les tableaux floristiques 2007 et 2010, totalement appariés, ont été chacun analysés par une analyse factorielle des correspondances (AFC) (AFC₀₇ : 72 espèces × 40 relevés et AFC₁₀ : 72 espèces × 40 relevés). L'AFC est une analyse discriminante qui calcule à la fois une valeur pour les correspondances d'espèces afin de maximiser la variance inter-sites et une valeur pour les correspondances de sites afin de maximiser la variance inter-espèces. Puis, les valeurs des coordonnées des AFC (AFC₀₇ et AFC₁₀) ont été soumises à une analyse de co-inertie (ACI), qui garantit la plus grande cohérence possible entre les deux systèmes de coordonnées. La co-structure des deux tableaux espèces × relevés, 2007 et 2010, a été testée par un test de permutations de Monte-Carlo (n=999). Les coordonnées des axes 1 et 2, obtenues par l'analyse de co-inertie, ont ensuite été testées pour chaque traitement, entre 2007 et 2010, par un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon après avoir testé la non-normalité des résidus par le test de Shapiro-Wilk.

Les variables de végétation et du sol, mesurées pendant l'expérimentation, ont été analysées en considérant d'une part l'effet combiné de l'azote et de la coupe et d'autre part

l'effet de la forme d'azote. Cependant les biomasses récoltées en 2008 et 2009 n'ont pas pu être prise en compte dans les analyses faute de temps. La distribution normale des résidus et l'homogénéité des variances ont respectivement été testées par le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett. Lorsque la normalité des résidus n'a pas été observée, les variables ont subi une transformation logarithmique (log) préalablement aux analyses. L'effet des traitements, quantité d'azote et coupe, a été testé à l'aide d'un modèle linéaire mixte en intégrant l'effet de ces deux facteurs, seuls et en interaction, comme effet fixe avec l'effet bloc comme effet aléatoire. Les différences entre les modalités des traitements ont été déterminées par des comparaisons multiples dans les sous-jeux de données. L'effet de la forme d'azote a également été testé dans un modèle linéaire mixte en intégrant uniquement la forme d'azote comme effet fixe et l'effet bloc comme effet aléatoire. Les différences entre les modalités du traitement ont également été testées. Toutes les analyses ont été conduites sous le logiciel R (R.2.13.0 ; R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Austria).

Résultats

Les différences de composition floristique au cours de l'expérimentation sont décrites par l'ACI des AFC₀₇ et AFC₁₀. Les deux premiers axes de l'ACI (72 espèces × 80 quadrats) représentent 74,4% de la variation totale de l'analyse (valeurs propres : $\lambda_1=0,058$ et $\lambda_2=0,016$) (Figure 3.3). Les espèces expliquant les gradients floristiques sont respectivement pour l'axe 1 : *Carum verticillatum*, *Polygala serpyllifolia* et *Veronica officinalis* sur la partie négative de l'axe opposée à *Erica ciliaris*, *Erica scoparia* et *Thymus pulegioides* sur la partie positive de l'axe et pour l'axe 2 : *Euphrasia stricta*, *Hypericum perforatum* et *Orchis morio* sur la partie négative de l'axe opposée à *Carex binervis*, *Dactylorhiza maculata* et *Molinia caerulea* sur la partie positive de l'axe. La végétation du site montre une composition floristique stable au cours de l'expérimentation malgré la forte variabilité de composition au sein de chaque traitement. L'effet des traitements sur la composition de la végétation au cours de l'expérimentation est indiqué par les différences de coordonnées de l'ACI (Tableau 3.3). La composition de la végétation reste globalement stable le long de l'axe 1 de l'ACI puisqu'aucune différence significative n'est remarquée entre le début et la fin de l'expérimentation quel que soit le traitement. En revanche, le long de l'axe 2, la composition floristique montre de légères différences au cours de l'expérimentation avec le traitement d'azote oxydé (N70oxy) et le traitement deux coupes par an (C1) dans le cas du traitement d'azote contrôle (N00). Ces changements temporels sont tous les deux dirigés vers la partie positive de l'axe 2.

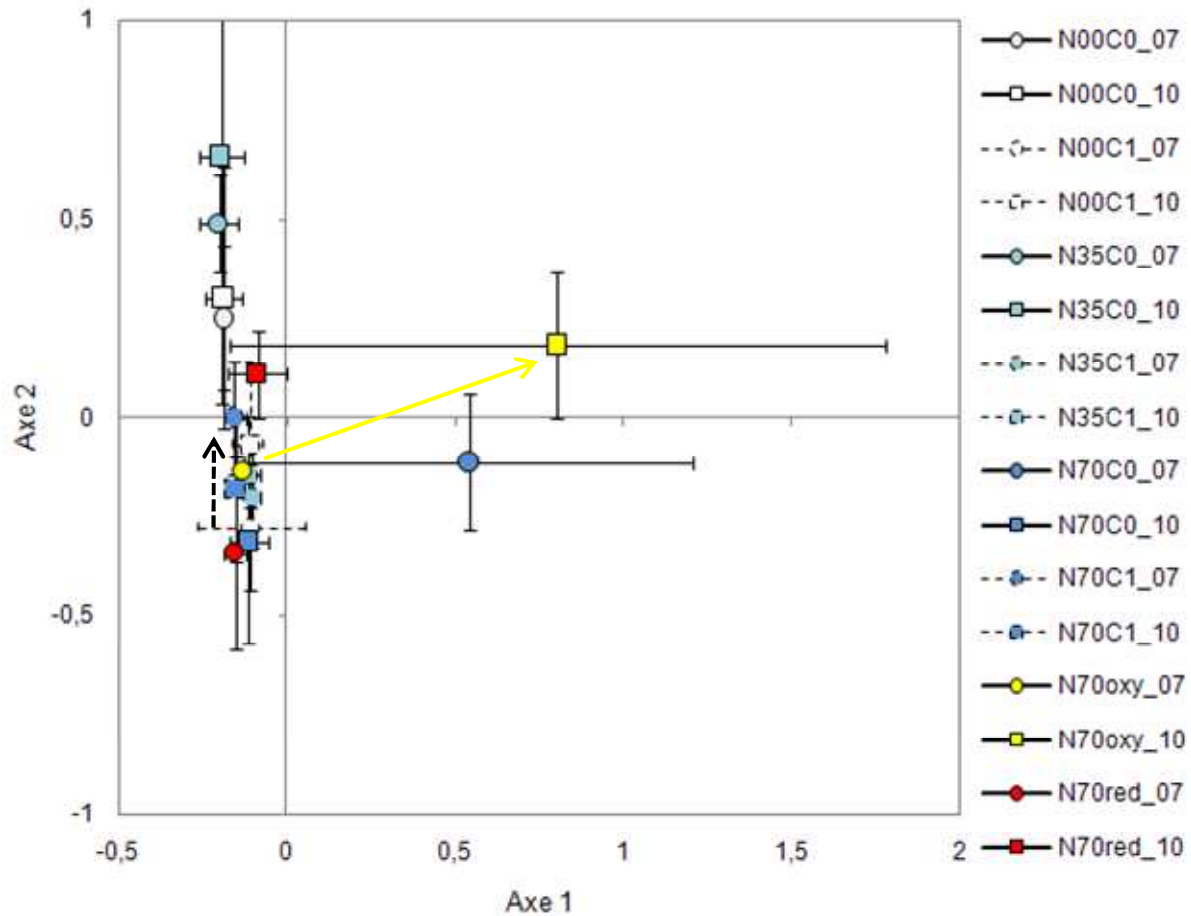


Figure 3.3. Analyse de co-inertie (ACI) (72 espèces x 80 relevés) avec les analyses factorielles des correspondances (AFC) des relevés 2007 et 2010. La distribution des coordonnées est représentée, le long des axes 1 et 2, par la moyenne des coordonnées (\pm erreur standard) pour chaque traitement et chaque année. Les traitements sont symbolisés par une couleur et un contour selon la quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹), la coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) et la forme d'azote (N70tot : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70oxy : 70 kg NaNO₃ ha⁻¹an⁻¹ et N70red : 70 kg NH₄Cl). Les flèches sont indiquées quand le changement de coordonnées entre les deux dates est significatif pour un même traitement. La significativité de la co-structure a été testée (P=0,001) et les deux premiers axes représentent 74,4% de la variance totale de la composition floristique.

Tableau 3.3. Comparaison des coordonnées moyennes entre 2007 et 2010 pour chaque traitement. Les différences des coordonnées ont été calculées pour les axes 1 et 2 de l'ACI et testées par le test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec les valeurs de probabilité p quand p<0,1 et ns: non significatif.

traitement	Axis1				Axis2			
	2007	2010	différence	p-value	2007	2010	différence	p-value
N00C0	-0,186	-0,187	0,000	ns	0,252	0,303	-0,051	ns
N00C1	-0,106	-0,107	0,000	ns	-0,278	-0,069	-0,209	p=0,059
N35C0	-0,202	-0,195	-0,006	ns	0,490	0,662	-0,172	ns
N35C1	-0,100	-0,111	0,011	ns	-0,202	-0,144	-0,058	ns
N70C0	0,541	-0,113	0,654	ns	-0,112	-0,312	0,199	ns
N70C1	-0,156	-0,152	-0,003	ns	-0,053	-0,182	0,129	ns
N70oxy	-0,130	0,804	-0,933	ns	-0,134	0,048	-0,182	p=0,059
N70red	-0,153	-0,087	-0,066	ns	-0,341	-0,170	-0,171	ns

Effet de la quantité d'azote et de la fauche

Les variables mesurées sur la végétation et le sol montrent des différences significatives, ou marginalement significatives, selon les traitements azote et coupe (Tableau 3.4). Au niveau aérien, la structure de la végétation indique des différences significatives de biomasse avec le traitement coupe, qui se traduisent par une diminution de la biomasse totale en 2010 avec le régime de coupe le plus important (C1) (Figure 3.4).

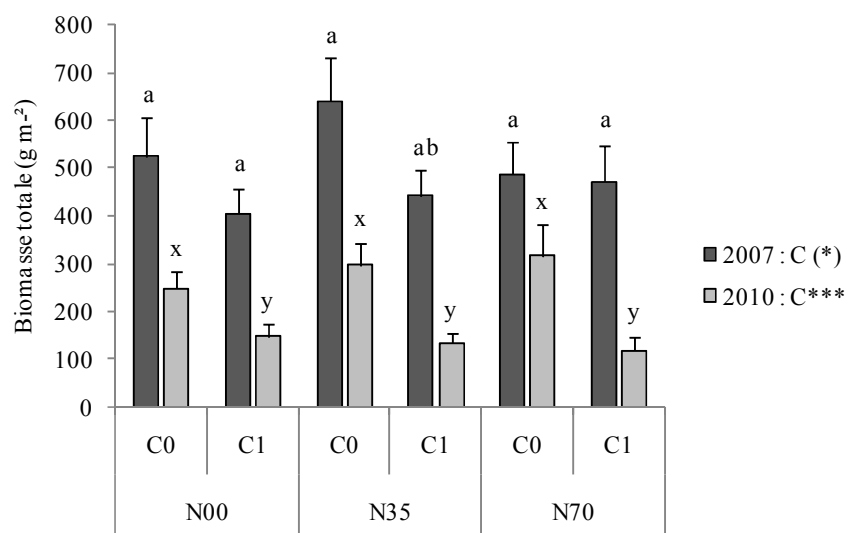


Figure 3.4. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) et coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) sur la biomasse totale (g m⁻²) (± erreur standard) en 2007 et 2010. Les différences significatives selon les traitements sont indiquées avec *** : p<0,001 ; ** : p<0,01 ; * : p<0,5 et (*) : p<0,1. Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Toutefois, l'état initial, en 2007, de la biomasse de graminoides montrait déjà une diminution significative avec le traitement C1 (F=5,260 ; P=0,033), reliée uniquement à un effet marginalement significatif de la biomasse totale. Par ailleurs, la biomasse récoltée en 2010 montre une diminution globale, quel que soit le traitement, par rapport à la biomasse initiale.

Tableau 3.4. Effets des traitements quantité d'azote, coupe et de leur interaction sur l'ensemble des variables mesurées avec le degré de liberté (ddl), la valeur du test F (Fisher) et la valeur de probabilité (p) donnée pour la significativité du traitement. Les valeurs de p significatives ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) sont représentées en gras et les valeurs de p marginalement significatives ($p < 0,1$) sont représentées en italique.

Variable	Azote		Coupe		Azote × Coupe	
	ddl	F	p	ddl	F	p
Structure de la végétation aérienne						
biomasse dicotylédones 2010 (g)	2	0,251	0,780	1	0,323	0,576
biomasse graminoides 2010 (g)	2	0,531	0,596	1	6,131	0,022
biomasse Cypéracées 2010 (g)	2	0,914	0,417	1	0,134	0,718
biomasse Fabacées 2010 (g)	2	0,396	0,678	1	5,022	0,037
biomasse totale 2010 (g)	2	0,128	0,881	1	20,682	0,000
nombre relatif d'espèces	2	0,975	0,394	1	4,913	0,038
atténuation février 2009 (%)	2	5,053	0,017	1	29,611	<0,001
atténuation juin 2009 (%)	2	0,242	0,788	1	43,334	<0,001
atténuation septembre 2009 (%)	2	0,063	0,939	1	0,766	0,392
Structure de la végétation souterraine						
biomasse racinaire (g m ⁻³) 2010	2	2,129	0,145	1	0,269	0,610
volume racinaire (cm ³) 2010	2	2,723	0,090	1	0,000	0,993
Chimie de la végétation						
C 2010 (g kg ⁻¹)	2	0,600	0,536	1	1,700	0,207
N 2010 (g kg ⁻¹)	2	0,332	0,721	1	0,645	0,431
C:N ratio 2010	2	0,542	0,590	1	1,315	0,265
P 2010 (g kg ⁻¹)	2	3,028	0,071	<i>1</i>	<i>3,658</i>	<i>0,070</i>
K 2010 (g kg ⁻¹)	2	0,011	0,989	1	15,387	0,001
Chimie de la végétation souterraine						
C 2010 (%)	2	0,200	0,824	1	0,000	0,835
N 2010 (%)	2	4,469	0,025	1	0,588	0,452
C:N ratio 2010	2	4,861	0,019	1	0,736	0,401
Chimie du sol						
pH 2010	2	0,060	0,942	1	0,026	0,873
N total 2009 (µg 10 cm ⁻² cm ⁻¹ profondeur)	2	1,786	0,193	1	0,155	0,698
NO ₃ ⁻ 2009 (µg 10 cm ⁻² cm ⁻¹ profondeur)	2	3,250	0,060	1	0,290	0,596
NH ₄ ⁺ 2009 (µg 10 cm ⁻² cm ⁻¹ profondeur)	2	0,585	0,567	1	1,364	0,257

La diminution de biomasse totale s'explique notamment par la diminution des groupes fonctionnels graminoides et Fabacées, avec le régime de coupe le plus intense (C1), puisqu'ils représentent la plus grande proportion de la biomasse totale, quel que soit le traitement (Figure 3.5). En revanche, les autres groupes fonctionnels, les Cypéracées et les dicotylédones, ne montrent aucune variation de biomasse selon les traitements. L'intensité de la coupe visible sur la biomasse 2010 est également notable à travers les mesures d'atténuation de lumière par le couvert végétal (Figure 3.6). En effet, au début de la saison de végétation, en février, l'atténuation lumineuse est moins importante dans les lots coupés deux fois. Cet effet est d'autant plus marqué pour les lots les plus fertilisés avec 70 kg N ha⁻¹ an⁻¹. De même, au pic de la saison de végétation, en juin, l'atténuation lumineuse est toujours moins importante dans les lots coupés deux fois mais cet effet de la coupe est identique le long du gradient d'azote. En revanche, l'atténuation lumineuse mesurée après la première coupe, en septembre, est identique pour tous les traitements. Ces effets n'ont pas été

corroborés par les résultats de densité et de hauteur de végétation, qui n'ont montré aucune tendance significative selon les traitements et ne sont donc pas montrés dans cette étude.

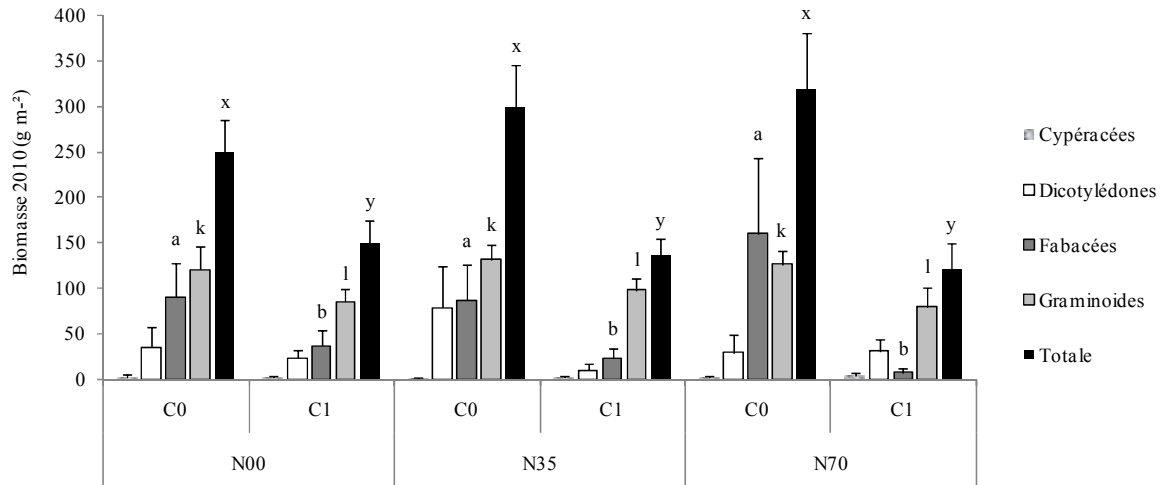


Figure 3.5. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) et coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) sur la biomasse estivale 2010 des différents groupes fonctionnels et totale (g m²) (± erreur standard). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes. Seules les variables présentant des différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.4).

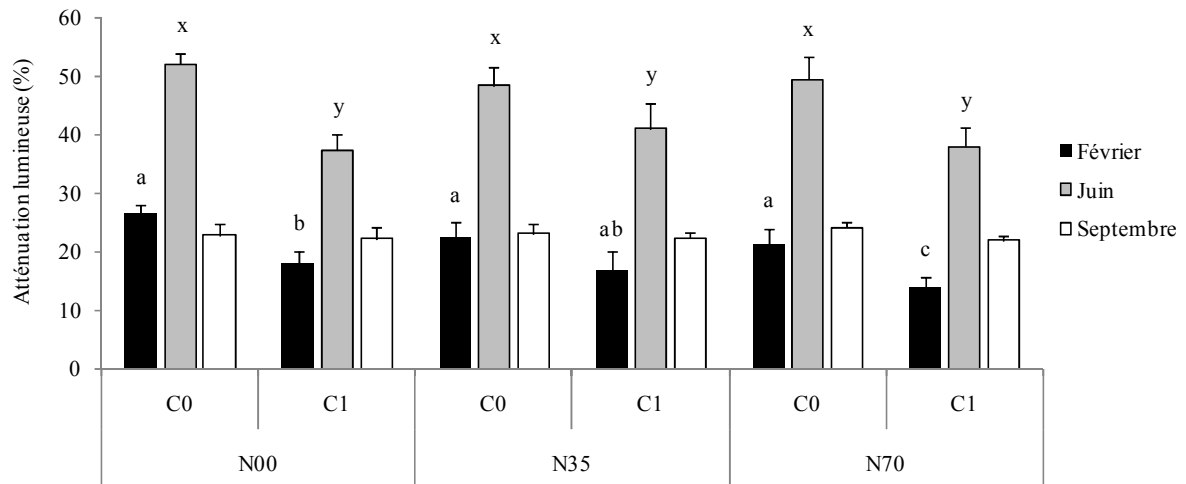


Figure 3.6. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) et coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) sur l'atténuation lumineuse au sol (%) par le couvert végétal (± erreur standard) mesurés en février, en juin et en septembre. Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes. Seules les variables présentant des différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.4).

Le nombre relatif d'espèces, traduisant les différences de richesse spécifique entre le début et la fin de l'expérimentation, est relativement stable selon les traitements (Figure 3.7). Toutefois le nombre d'espèce tend à augmenter significativement avec l'intensité de la coupe, uniquement lors d'apport maximal d'azote à 70 kg N ha⁻¹ an⁻¹.

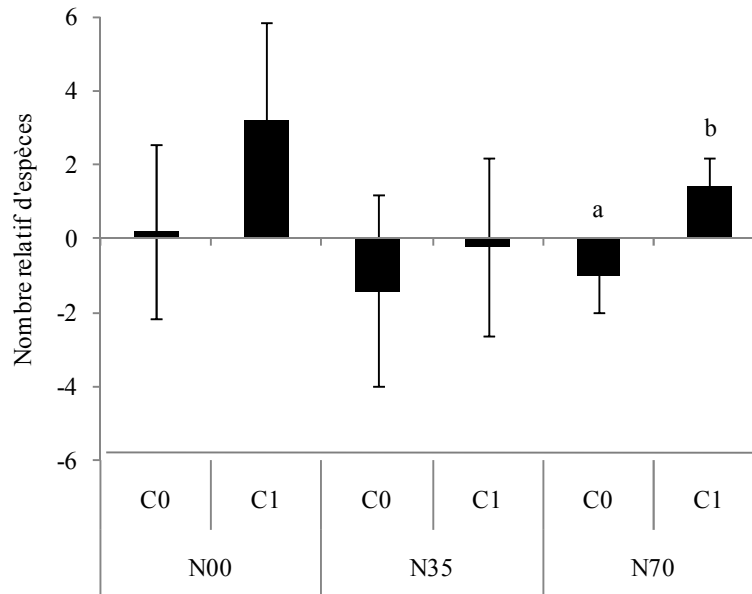


Figure 3.7. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) et coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) sur le nombre relatif d'espèces (\pm erreur standard), déterminé par la différence du nombre d'espèces entre 2007 et 2010, pour chaque traitement. Les barres ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes. Seules les différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.4).

Au niveau de la végétation souterraine, l'effet des traitements est visible sur la biomasse racinaire et sur le ratio racinaire C:N (Figure 3.8). En effet, la biomasse racinaire montre une diminution avec l'intensité de la coupe (C1) lorsqu'il n'y a pas de fertilisation. De plus, la biomasse racinaire diminue avec l'intensité de la coupe (C1) aux plus fortes doses d'azote (70 kg N ha⁻¹ an⁻¹). Le ratio racinaire C:N varie uniquement en fonction de la fertilisation azotée, avec une diminution significative suite à l'application d'azote quelque soit la dose.

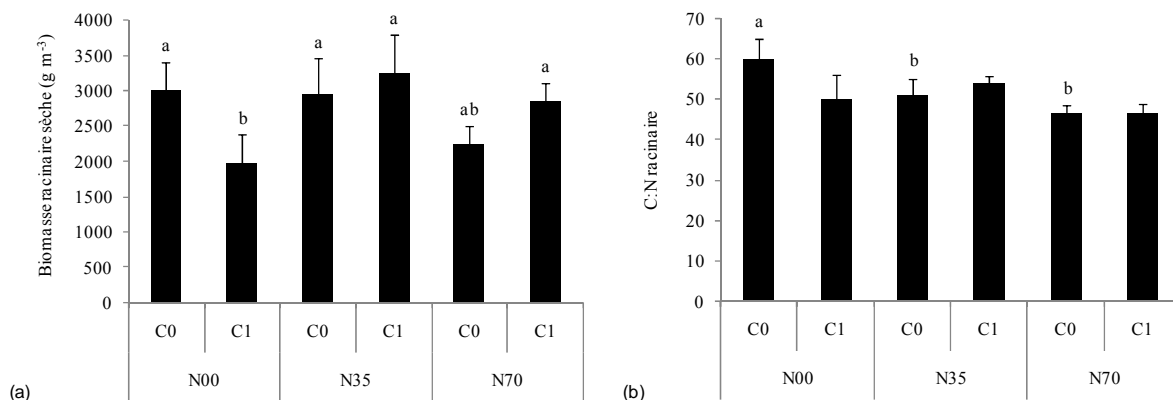


Figure 3.8. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : 35 kg N ha⁻¹an⁻¹ ; N70 : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹) et coupe C (C0 : 1 coupe an⁻¹ ; C1 : 2 coupes an⁻¹) sur (a) la biomasse racinaire (g m⁻³) et (b) le ratio C:N racinaire (\pm erreur standard). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes. Seules les variables présentant des différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.4).

Au niveau du sol, les réserves en azote total disponible sont modifiées selon les doses d'azote appliquées en interaction avec le régime de coupe (Figure 3.9). Notamment, en absence d'apport azoté, la disponibilité en azote total diminue avec l'intensité de la coupe (C1). Au contraire, lors d'un apport modéré en azote ($35 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$), la disponibilité en azote total augmente avec l'intensité de la coupe (C1). Cette différence de disponibilité en azote total dans le sol s'explique uniquement par des différences de disponibilité en nitrates (NO_3^-) du sol alors que la disponibilité en ammonium (NH_4^+) reste identique le long du gradient de fertilisation azotée et de coupe.

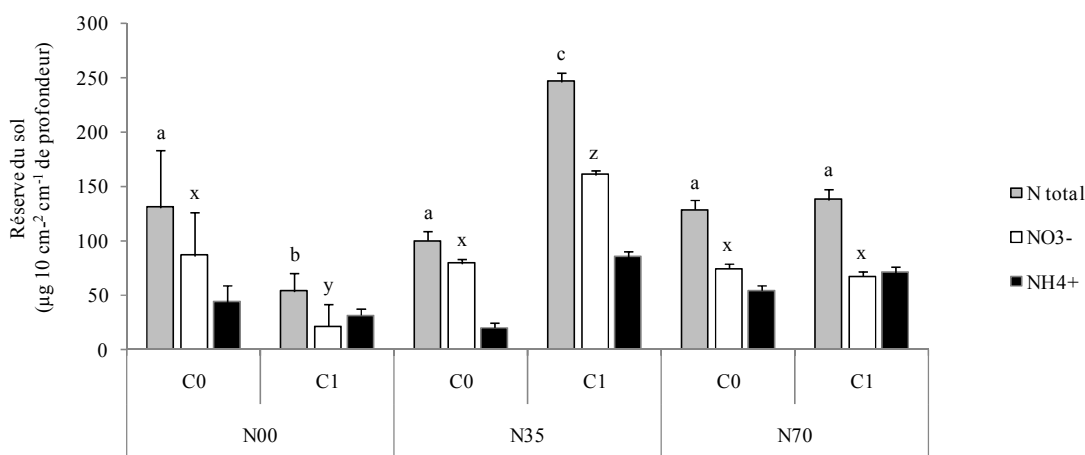


Figure 3.9. Effets des traitements quantité d'azote N (N00 : témoin ; N35 : $35 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$; N70 : $70 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) et coupe C (C0 : 1 coupe an^{-1} ; C1 : 2 coupes an^{-1}) sur les réserves disponibles du sol en azote total, en NO_3^- et en NH_4^+ (\pm erreur standard). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Effet de la forme de N

L'application distincte à forte dose de l'azote sous forme totale, oxydée et réduite entraîne des effets très marqués mais sur un faible nombre de variables (Tableau 3.5). La forme d'azote a notamment un effet très significatif sur la structure de la végétation en agissant à la fois sur la biomasse des graminoides et sur le nombre relatif d'espèces au cours de l'expérimentation. L'effet de la forme d'azote est également visible sur les processus du sol en influençant les réserves d'azote disponible dans le sol, en nitrates et ammonium. En revanche, l'application de différentes formes d'azote n'entraîne aucun effet sur la structure de la végétation souterraine et sur la chimie de la végétation aérienne et souterraine.

Tableau 3.5. Effets du traitement forme d'azote sur l'ensemble des variables mesurées avec le degré de liberté (ddl), la valeur du test F (Fisher) et la valeur de probabilité (p) donnée pour la significativité du traitement. Les valeurs de p significatives ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) sont représentées en gras et les valeurs de p marginalement significatives ($p < 0,1$) sont représentées en italique.

Variable	Azote		
	ddl	F	p
<i>Structure de la végétation aérienne</i>			
biomasse dicotylédones 2010 (g)	2	1,420	0,297
biomasse graminoides 2010 (g)	2	6,123	0,024
biomasse Cypéracées 2010 (g)	2	0,416	0,673
biomasse Fabacées 2010 (g)	2	1,452	0,290
biomasse totale 2010 (g)	2	0,585	0,580
nombre relatif d'espèces	2	12,304	0,004
atténuation février 2009 (%)	2	0,143	0,869
atténuation juin 2009 (%)	2	0,359	0,709
atténuation septembre 2009 (%)	2	2,519	0,142
<i>Structure de la végétation souterraine</i>			
biomasse racinaire (g m^{-3}) 2010	2	0,275	0,767
volume racinaire (cm^3) 2010	2	0,147	0,866
<i>Chimie de la végétation</i>			
N:P ratio 2007	2	0,002	0,998
C 2010 (g kg^{-1})	2	0,900	0,437
N 2010 (g kg^{-1})	2	2,097	0,185
C:N ratio 2010	2	2,302	0,162
P 2010 (g kg^{-1})	2	2,984	0,108
K 2010 (g kg^{-1})	2	0,312	0,741
<i>Chimie de la végétation souterraine</i>			
C 2010 (%)	2	0,100	0,949
N 2010 (%)	2	0,291	0,755
<i>Chimie du sol</i>			
pH 2010	2	1,480	0,284
N total 2009 ($\mu\text{g } 10 \text{ cm}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ profondeur)	2	0,445	0,656
NO_3^- 2009 ($\mu\text{g } 10 \text{ cm}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ profondeur)	2	5,652	0,030
NH_4^+ 2009 ($\mu\text{g } 10 \text{ cm}^{-2} \text{ cm}^{-1}$ profondeur)	2	3,830	0,068

Au niveau de la végétation, la biomasse des graminoides montre une augmentation significative avec l'apport d'azote oxydé (Figure 3.10). En revanche, la biomasse des graminoides diminue avec l'apport d'azote réduit par rapport à la forme oxydée. Malgré la proportion importante de graminoides, la biomasse totale ne montre aucune différence significative en fonction des formes d'azote. La forme d'azote a un effet encore plus important sur le nombre relatif d'espèces entre 2007 et 2010 (Figure 3.11). En effet, la richesse spécifique indique une augmentation significative lors de l'application d'azote oxydé par rapport à l'addition d'azote total ou réduit. Inversement, le nombre d'espèces diminue avec l'application d'azote réduit par rapport à l'addition d'azote total ou oxydé. En revanche, le nombre d'espèces apparaît relativement stable au cours de l'expérimentation lorsque l'azote est appliqué sous forme totale.

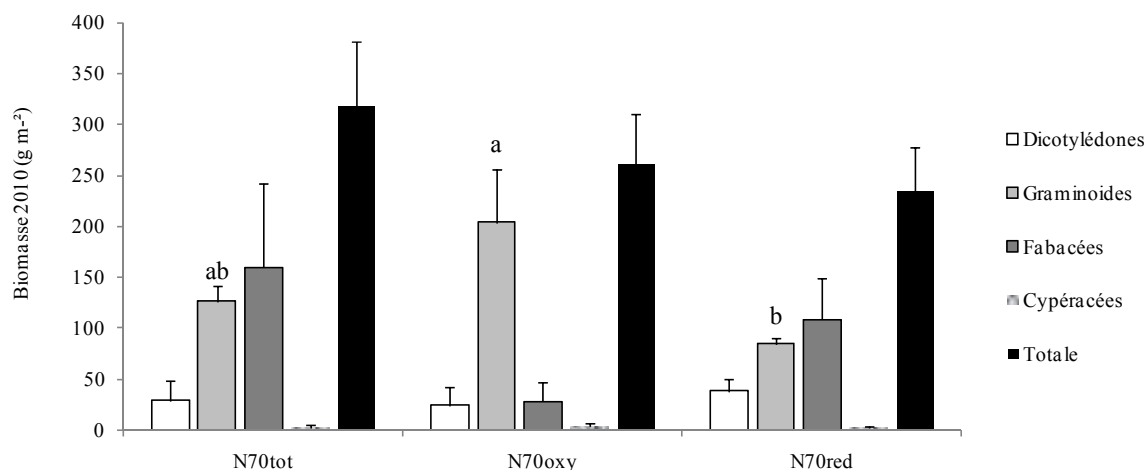


Figure 3.10. Effets du traitement forme d'azote (N70tot : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹; N70oxy : 70 kg NaNO₃ ha⁻¹an⁻¹ et N70red : 70 kg NH₄Cl) sur la biomasse estivale 2010 des différents groupes fonctionnels et totale (g m²) (± erreur standard). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes. Seules les variables présentant des différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.5).

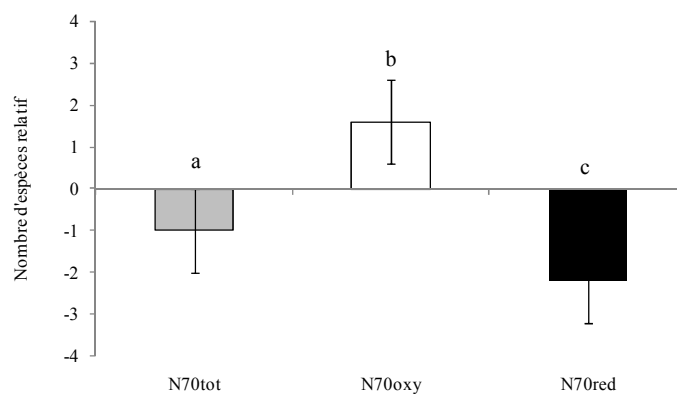


Figure 3.11. Effets du traitement forme d'azote (N70tot : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹; N70oxy : 70 kg NaNO₃ ha⁻¹an⁻¹ et N70red : 70 kg NH₄Cl) sur le nombre relatif d'espèces (± erreur standard), déterminé par la différence d'espèces entre 2007 et 2010, pour chaque traitement. Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes.

L'effet distinct des formes d'azote, oxydée et réduite, est également visible au niveau des processus du sol en influençant la disponibilité en azote sous forme de nitrates et d'ammonium (Figure 3.12). En effet, la disponibilité en nitrates diminue avec l'apport d'azote réduit tandis qu'elle est augmentée à la fois avec l'apport d'azote sous forme totale et oxydée. Au contraire, lors de l'application d'azote réduit, la disponibilité en ammonium est significativement favorisée en comparaison de l'application sous forme totale ou oxydée. Cependant, la disponibilité en azote total, regroupant les nitrates et l'ammonium, reste identique quelle que soit la forme d'azote apporté due aux variations opposées de disponibilité en ammonium et nitrates. Le traitement, forme d'azote, agit donc uniquement sur la nature de l'azote disponible et non pas sur la quantité d'azote totale disponible qui n'est pas différente selon le traitement appliqué.

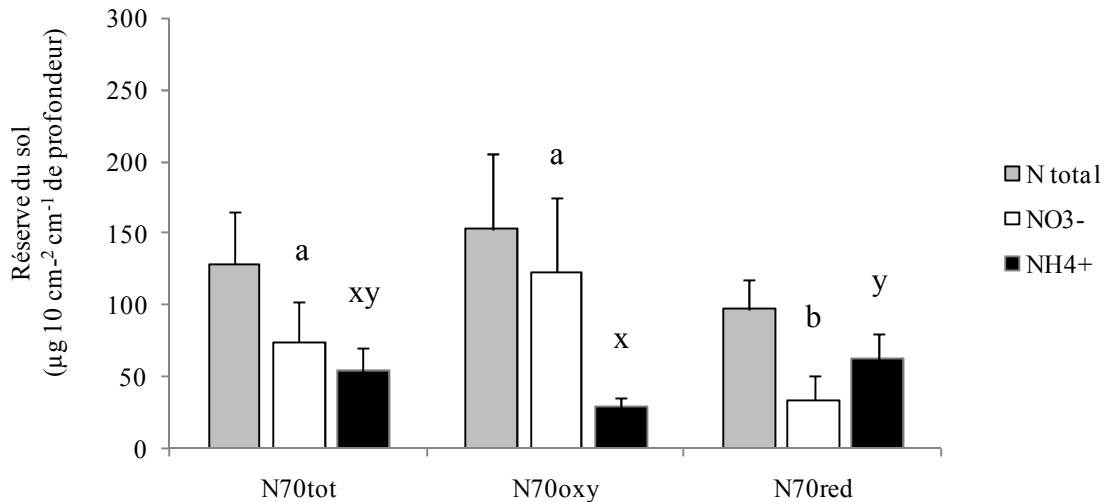


Figure 3.11. Effets du traitement forme d'azote (N70tot : 70 kg N ha⁻¹an⁻¹; N70oxy : 70 kg NaNO₃ ha⁻¹an⁻¹ et N70red : 70 kg NH₄Cl) sur les réserves disponibles du sol en azote total, en NO₃⁻ et en NH₄⁺ (± erreur standard). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes. Seules les variables présentant des différences significatives selon les traitements ont été testées (cf tableau 3.5).

Discussion

Les prairies acides sont considérées comme des écosystèmes sensibles à l'enrichissement en azote puisque, dans ces systèmes, l'azote représente le principal nutriment limitant (Vitousek & Howarth, 1991), les taux de production sont faibles (Chapin *et al.*, 1986), la capacité à neutraliser l'acidité du sol est limitée (Roem *et al.*, 2002 ; Horswill *et al.*, 2008 ; Maskell *et al.*, 2010) et de nombreuses espèces de dicotylédones présentes sont connues pour être sensibles aux apports azotés (Suding *et al.*, 2005 ; Van den Berg *et al.*, 2005 ; Kleijn *et al.*, 2008). Pourtant, des quatre hypothèses impliquant l'effet de l'azote sur la végétation, l'hypothèse de toxicité de l'azote réduit est celle qui est la plus vérifiée par les résultats de cette étude.

Effet de la quantité d'azote

L'hypothèse de diminution de la richesse spécifique avec l'apport d'azote, suite à l'augmentation de la productivité des graminoides entraînant le déclin des plantes de petite stature, n'a pas été corroborée dans cette étude. En effet, aucune modification de la végétation aérienne n'est décelée avec l'application croissante d'azote total, aussi bien au niveau de la structure que de la composition chimique de la végétation. Ainsi, la biomasse totale et la richesse spécifique ne semblent pas répondre aux traitements de fertilisation d'azote total (Carroll *et al.*, 2003 ; Bret-Harte *et al.*, 2008). Notamment, les graminoides, supposés favorisés par cet apport d'azote, ne montrent aucune réponse vis-à-vis de la dose d'azote appliquée pendant 4 ans (Bai *et al.*, 2010). De même, la biomasse des dicotylédones, sensibles aux dépôts d'azote (Maskell *et al.*, 2010), n'est pas modifiée par l'apport d'azote total. Le

maintien de la composition et de la richesse spécifique avec la fertilisation azotée supposerait donc d'autres mécanismes que la compétition pour la lumière (Rajaniemi, 2002 ; Dickson & Foster, 2011). Dans ce sens, la diminution significative de la biomasse racinaire et du rapport C:N des racines avec l'addition d'azote, principalement à fortes doses, suggère des mécanismes souterrains plutôt qu'aériens. Ainsi, l'augmentation des ressources du sol en azote pourrait entraîner une diminution de la compétition souterraine entre les plantes (Wilson & Tilman, 1991; Peltzer *et al.*, 1998 ; Cahill, 1999), ce qui serait cohérent avec la baisse de biomasse et du rapport C:N racinaire et l'augmentation de la disponibilité en nitrates à partir d'une fertilisation modérée d'azote. Cependant, l'échelle d'étude, considérant l'ensemble de la communauté végétale, ne permet pas d'intégrer les dynamiques d'interactions entre espèces pour prédire le résultat de la compétition dans des conditions de fertilisation (Wedin & Tilman, 1993 ; Falkengren-Grerup, 1998).

Ces résultats contrastent avec les études précédentes dans lesquelles la compétition pour la lumière provoquait une diminution de la richesse spécifique suite à une eutrophication, cependant ces études ont été menées dans des milieux neutres ou alcalins (Wilson & Tilman, 1993 ; Hautier *et al.*, 2009). Ces différences peuvent s'expliquer par des variations floristiques, spatiales et temporelles, soutenues par une analyse robuste des données puisque l'analyse intègre l'hétérogénéité floristique du site, considéré comme une variable aléatoire, et les variations interannuelles de la végétation en considérant l'accumulation d'azote après quatre ans d'expérimentation. En outre, cette étude contraste également par les faibles doses d'azote appliquées. En effet, les expérimentations à court-terme, étudiant l'impact de l'azote sur la végétation des prairies acides, ont considéré des doses d'azote très élevées ($> 100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) (Morecroft *et al.*, 1994 ; Carroll *et al.*, 2003 ; Pilkington *et al.*, 2005) tandis que les études considérant de faibles doses d'azote ($10 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$), ont montré un effet sur la richesse spécifique à long-terme, environ 20 ans (Clark & Tilman, 2008). Cependant, la communauté végétale étudiée est supposée répondre rapidement à une augmentation soudaine de dépôts d'azote, du fait de sa localisation dans une zone recevant de faibles dépôts d'azote ambiants (Vergeer *et al.*, 2008) et des quantités d'azote appliquées, nettement supérieures aux charges critiques situées entre 10 et $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Bobbink & Hettelingh, 2011).

Ainsi, l'absence de réponse claire de la végétation et du sol supposerait d'autres mécanismes tels que l'immobilisation de l'azote par les micro-organismes du sol ou la faible rétention de l'azote dans le sol, qui empêche son accumulation dans le système. En effet, au cours de l'expérimentation, le pH et le rapport C:N du sol restent stables malgré la faible capacité du milieu à neutraliser l'acidité. Dans notre étude, la compétition pour l'azote entre les micro-organismes et les plantes est peu probable car, même si elle peut être importante dans les écosystèmes semi-naturels dont le sol n'est pas perturbé (Burger & Jackson, 2003), elle reste minime dans les sols secs (Rennenberg *et al.*, 2009). L'absence de tendance explicite dans le contenu en azote de la végétation et du sol en fonction de la fertilisation

indiquerait principalement une faible capacité de rétention de l'azote par le sol qui peut s'expliquer par une lixiviation de nitrates et d'azote organique (Clark *et al.*, 2009). La forte augmentation des nitrates du sol, ponctuellement dans le cas d'apport modéré d'azote et d'un régime de coupe intensif, suggère que la lixiviation des nitrates pourrait être une voie substantielle de perte d'azote dans les prairies acides, notamment à $70 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Phoenix *et al.*, 2003). En effet, les nitrates chargés négativement ne peuvent pas s'accumuler dans le sol en l'absence de prélèvement par les plantes ou les micro-organismes. Dans notre étude, le faible rapport C:N du sol ($\text{C:N} < 20$), la forte pluviométrie hivernale et la faible rétention en eau du sol, due à sa texture sableuse, rendent d'autant plus probable la lixiviation comme une voie majeure de perte d'azote en dehors du système (Dise *et al.*, 2009). Ce processus aurait pu se dérouler très rapidement, dans l'année suivant l'enrichissement en azote (Pilkington *et al.*, 2007). Les pertes d'azote organique dissous n'ont pas été prises en compte bien qu'elles puissent également contribuer à la réduction d'azote dans le système (Pilkington *et al.*, 2005). Les autres voies possibles de perte d'azote n'ont pas été mesurées car elles sont supposées négligeables. En effet, la dénitrification de flux gazeux de N_2O et NO se produit en conditions anaérobies, par conséquent elle est supposée négligeable dans les sols sableux bien aérés (Barton *et al.*, 1999). De même, la volatilisation d'ammonium, conséquente dans les sites agricoles, est limitée dans les prairies semi-naturelles, surtout acides, avec des taux de volatilisation inférieurs à 6% (Phoenix *et al.*, 2003).

Enfin, la sensibilité du milieu à l'azote peut être davantage déterminée par les conditions environnementales que par la faible productivité ou la présence de groupes fonctionnels sensibles dans la communauté (Clark *et al.*, 2007). Ainsi, les conditions édaphiques et climatiques expliqueraient davantage l'absence de réponse de la végétation aux apports d'azote, et notamment la baisse globale de biomasse au cours de l'expérimentation. Concernant les conditions édaphiques, la disponibilité des ressources du sol pourrait expliquer l'effet limité de la fertilisation azotée si la végétation était limitée par une autre ressource que l'azote. En effet, l'apport d'azote a tendance à lever la limitation du phosphore (données non montrées), qui pourrait donc jouer un rôle important dans la limitation du milieu (Thayer *et al.*, 2008). A long-terme, la disponibilité du phosphore, qui affecte principalement la composition floristique, pourrait altérer les prairies acides davantage résilientes à l'apport d'azote que de phosphore (Johnson *et al.*, 1999 ; Phoenix *et al.*, 2003, Pilkington *et al.*, 2007 ; Ceulemans *et al.*, 2011). Cependant, les prairies acides seraient limitées dans une moindre mesure par le phosphore, contrairement à d'autres systèmes tels que les prairies calcaires qui sont limitées à parts égales par l'azote et le phosphore (Morecroft *et al.*, 1994). Concernant les conditions climatiques, celles-ci pourraient altérer les effets de l'azote (Majdi & Ohrvik, 2004 ; Clark *et al.*, 2007). Cependant, la température et l'apport d'azote agissent indépendamment sur le milieu (Pan *et al.*, 2009 ; Papanikolaou *et al.*, 2010). En effet, la diminution croissante de la disponibilité en eau du sol, traduit par la différence entre les précipitations et l'évapotranspiration du milieu (Tableau 3.1), semble affecter la végétation indépendamment du traitement azoté. La croissance de la végétation serait donc

essentiellement restreinte par la contrainte hydrique, qui dominerait ainsi l'impact de l'addition d'azote (Huxman *et al.*, 2004 ; Pennington & Collins, 2007 ; Bai *et al.*, 2010). Cependant, l'effet à long-terme du changement climatique avec les dépôts d'azote, reste à définir puisque l'effet des dépôts azotés pourrait être prédominant si la végétation montre une résilience aux effets climatiques pendant plusieurs années (Grime *et al.*, 2008 ; Pan *et al.*, 2009).

Effet de la fauche combinée à la quantité d'azote

La fauche montre un effet marqué sur la végétation principalement par la diminution du couvert des espèces (Bobbink & Willems, 1991 ; Hartley & Mitchell, 2005). Les tendances de changements de composition pourraient mener à un changement de la communauté sur le long terme (Plassmann *et al.*, 2009). La végétation semble donc réagir plus sévèrement et plus rapidement à la coupe qu'à l'apport d'azote. Malgré l'absence de compétition pour la lumière, nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont montré que des coupes plus fréquentes pouvait être un moyen efficace de pallier un éventuel effet de l'azote (Britton *et al.*, 2001 ; Wamelink *et al.*, 2009). L'effet bénéfique de l'intensité de la coupe est visible en conditions fortement fertilisées, à travers une diminution de la biomasse des graminoides et des Fabacées avec un gain d'espèces simultanément. Cette effet bénéfique de l'azote et la coupe combiné peut s'expliquer par la formation d'ouverture dans le couvert végétal qui favorisent la colonisation ou le maintien des espèces (Calvo *et al.*, 2007). En effet, l'exclusion compétitive peut agir à travers d'autres mécanismes que la compétition pour la lumière, comme la présence de plantes de hautes statures mais éparpillées sur le site (Oksanen, 1996), un effet d'atténuation de la lumière au sol par la litière (Foster & Gross, 1998) ou un changement dans la composition de la communauté microbienne du sol (Johnson, 1993 ; Johnson *et al.*, 2003). L'intensité du régime de coupe, avec exportation de la biomasse, se prémunirait donc d'un éventuel effet de dilution des individus ainsi que d'une inhibition par la litière. Toutefois, l'absence d'interaction entre la coupe et l'azote relativise l'effet de la coupe, hormis pour la biomasse racinaire. Dans ce cas, les résultats indiquent que la compétition pour les ressources augmente avec la fertilité du milieu mais diminue d'autre part avec la perturbation du milieu (Grime, 1974 ; Campbell & Grime, 1992).

Effet de la forme d'azote

Si l'effet de l'azote total est faible du fait de l'incapacité de l'azote, notamment sous forme de nitrate, à être retenu dans le système, l'effet de la forme d'azote est très marqué notamment par la capacité de la forme réduite à s'accumuler dans le milieu. Les effets significatifs de l'azote réduit sont visibles par la diminution de biomasse de graminoides, due à la faible disponibilité en nitrate, ainsi que la diminution du nombre d'espèces, qui avère l'hypothèse d'un effet nocif de l'azote réduit (Krupa, 2003). Cette réponse des espèces vasculaires aux changements de ratio $\text{NH}_x:\text{NO}_y$, élevé avec l'apport d'azote réduit et faible avec l'apport d'azote oxydé, peut être provoqué en premier lieu par le taux de nitrification

(Stevens *et al.*, 2011). En revanche, le pH ne montre pas de modification puisque l'acidification du sol serait un processus à long terme (Blake *et al.*, 1999 ; Blaser *et al.*, 1999). La stabilité du pH s'expliquerait par l'application d'ammonium de type humide, agissant à long-terme sur les conditions biogéochimiques du sol, tandis que les dépôts secs d'ammoniac agirait rapidement sur la végétation par une toxicité foliaire directe (Sheppard *et al.*, 2011). Le maintien du pH (pH moyen de 5,3 avec l'azote réduit ou 5,4 avec l'azote oxydé) explique probablement la stabilité de composition spécifique alors que la richesse spécifique montre une diminution avec l'azote réduit. Dans les sols acides pourvus d'une faible capacité d'échange cationique, le cycle de l'ammonium est plus court entraînant une plus faible disponibilité de l'azote dans le sol. Au cours de l'évolution, la sélection a ainsi favorisée des espèces adaptées à ces habitats peu fertiles, capables de rendre efficace le prélèvement d'azote même à faibles concentrations (Aerts & Chapin, 2000), d'utiliser des sources alternatives d'azote (Schimel & Bennett, 2004), et avec des temps de rétention de nutriments importants (Aerts & Chapin, 2000). Ainsi, les espèces de dicotylédones comme les Ericacées, très abondantes sur le site, favorisent principalement l'absorption d'azote sous forme réduite tandis que les graminoides favorisent le prélèvement d'azote oxydé (Pearce & van der Wal, 2002). Le traitement d'azote réduit affecterait donc dans un premier temps les graminoides, dont la baisse de croissance est due à des coûts énergétiques importants d'exportation de NH_4^+ à l'extérieur des cellules (Britto & Kronzucker, 2002). Toutefois, certaines espèces, comme *Calluna vulgaris*, sont également très sensibles à l'ammonium, qui augmente leur sensibilité au stress hydrique (Sheppard *et al.*, 2008). Les différences de sensibilités des plantes aux modifications physicochimiques expliqueraient les réponses spécifiques de chaque espèce vis-à-vis de l'apport d'azote réduit (Pearson & Stewart, 1993). Pour l'instant, la stabilité du pH pourrait protéger les espèces de dicotylédones contre un éventuel déclin (Van den berg *et al.*, 2005), notamment des espèces rares, telles que *Dactylorhiza maculata*, *Pedicularis sylvatica* et *Polygala serpyllifolia*, persistant moins longtemps que les espèces communes à cause de leur faible amplitude d'exigences écologiques (Kleijn *et al.*, 2008).

Conclusion

Les dépôts d'azotes ont le potentiel d'altérer à la fois la végétation et les processus du sol, selon la quantité et la forme d'azote appliquées. Dans notre système d'étude de prairie acide, la compétition pour la lumière ne serait pas un mécanisme régissant la dynamique de la communauté en conditions fertiles. Toutefois, en conditions non fertiles, la végétation souterraine pourrait être contrainte par une compétition souterraine pour les ressources du sol. Mais l'absence de réponse claire de la végétation suggère plutôt des mécanismes tels que la faible rétention en azote du système ou la limitation par une autre ressource, telle que l'eau. Si l'hypothèse de compétition pour la lumière n'a pas été vérifiée dans cette étude, l'hypothèse de toxicité de l'azote réduit a été corroborée par la réponse très marquée des espèces vasculaires suite à l'application d'azote réduit. Cet apport a provoqué une diminution de la richesse spécifique causée principalement par une diminution de la nitrification. Mais, si cette

étude a montré l'importance de considérer la forme d'azote pour comprendre l'impact des dépôts d'azote sur les milieux, il reste nécessaire de connaître l'influence relative de la forme d'azote selon la quantité d'azote appliquée. Les habitats acides sont en premier lieu affectés par la forme d'azote et la remédiation des milieux par la fauche semble donc peu judicieuse alors que des pistes de restauration pourraient être envisagées pour rétablir les conditions biogéochimiques du sol à travers le chaulage ou l'apport de carbone organique.

Références

- Aerts R, Chapin FS (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. In: *Advances in Ecological Research, Vol 30* Vol. 30 (eds Fitter AH, Raffaelli DG), pp. 1-67. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.
- Arroniz-Crespo M, Leake JR, Horton P, Phoenix GK (2008) Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilisation in acidic grassland. *New Phytologist*, **180**, 864-874.
- Bai YF, Wu JG, Clark CM, *et al.* (2010) Tradeoffs and thresholds in the effects of nitrogen addition on biodiversity and ecosystem functioning: evidence from inner Mongolia Grasslands. *Global Change Biology*, **16**, 358-372.
- Barton L, McLay CDA, Schipper LA, Smith CT (1999) Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Australian Journal of Soil Research*, **37**, 1073-1093.
- Bensettiti F, Boulet V, Chavaudret-Laborie C, Deniaud J (2005) « Cahiers d'habitats » *Natura 2000. Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 4 - Habitats agropastoraux*. La documentation française, Paris.
- Blake L, Goulding KWT, Mott CJB, Johnston AE (1999) Changes in soil chemistry accompanying acidification over more than 100 years under woodland and grass at Rothamsted Experimental Station, UK. *European Journal of Soil Science*, **50**, 401-412.
- Blaser P, Zysset M, Zimmermann S, Luster J (1999) Soil acidification in southern Switzerland between 1987 and 1997: A case study based on the critical load concept. *Environmental Science & Technology*, **33**, 2383-2389.
- Bobbink R (1991) Effects of Nutrient Enrichment in Dutch Chalk Grassland. *Journal of Applied Ecology*, **28**, 28-41.
- Bobbink R, Willems JH (1991) Impact of different cutting regimes on the performance of *Brachypodium pinnatum* in dutch chalk grassland. *Biological Conservation*, **56**, 1-21.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, *et al.* (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, **20**, 30-59.
- Bobbink R, Hettelingh JP (2011) *Review and revision of empirical critical loads and dose-response relationships*. RIVM report 680359002, Coordination Centre for Effects, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Noordwijkerhout.
- Bret-Harte MS, Mack MC, Goldsmith GR, *et al.* (2008) Plant functional types do not predict biomass responses to removal and fertilization in Alaskan tussock tundra. *Journal of Ecology*, **96**, 713-726.

- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 567-584.
- Britton AJ, Pakeman RJ, Carey PD, Marrs RH (2001) Impacts of climate, management and nitrogen deposition on the dynamics of lowland heathland. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 797-806.
- Burger M, Jackson LE (2003) Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**, 29-36.
- Cahill JF (1999) Fertilization effects on interactions between above- and belowground competition in an old field. *Ecology*, **80**, 466-480.
- Calvo L, Alonso I, Marcos E, De Luis E (2007) Effects of cutting and nitrogen deposition on biodiversity in Cantabrian heathlands. *Applied Vegetation Science*, **10**, 43-52.
- Campbell BD, Grime JP (1992) An experimental test of plant strategy theory. *Ecology*, **73**, 15-29.
- Carroll JA, Caporn SJM, Johnson D, Morecroft MD, Lee JA (2003) The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **121**, 363-376.
- Ceulemans T, Merck R, Hens M, Honnay O (2011) A trait-based analysis of the role of phosphorus vs. nitrogen enrichment in plant species loss across North-west European grasslands. *Journal of Applied Ecology*, doi: 10.1111/j.1365-2664.2011.02023.
- Chapin III FS, Vitousek PM, Cleve KV (1986) The Nature of Nutrient Limitation in Plant Communities. *The American Naturalist*, **127**, 48-58.
- Chapman HD, Pratt PF (1985) *Methods for Analysis of Soils, Plants and Waters*. Agricultural Sciences Publications, California.
- Clark CM, Tilman D (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712-715.
- Clark CM, Hobbie SE, Venterea R, Tilman D (2009) Long-lasting effects on nitrogen cycling 12 years after treatments cease despite minimal long-term nitrogen retention. *Global Change Biology*, **15**, 1755-1766.
- Davies CE, Moss D & Hill MO (2004) *EUNIS habitat classification revised 2004*. Winfrith Technology Centre, Dorian Ecological Information Ltd. and Monks Wood, UK.
- De Foucault B (1986) Données systémiques sur la végétation prairiale mésophile du pays Basque et des landes de Gascogne. *Documents phytosociologiques*, **10**, 203-219.
- Dickson TL, Foster BL (2011) Fertilization decreases plant biodiversity even when light is not limiting. *Ecology Letters*, **14**, 380-388.
- Dise NB, Rothwell JJ, Gauci V, van der Salm C, de Vries W (2009) Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *Science of the Total Environment*, **407**, 1798-1808.
- Dorland E, Rotthier S & Bobbink R (2009) Protocol N-addition experiments, Objective C of the BEGIN project (EUROCORES programme).

- Duprè C, Stevens CJ, Ranke T, *et al.* (2010) Changes in species richness and composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344-357.
- Fagerli H, Aas W (2008) Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution*, **154**, 448-461.
- Falkengren-Grerup U (1998) Nitrogen response of herbs and graminoids in experiments with simulated acid soil solution. *Environmental Pollution*, **102**, 93-99.
- Foster BL, Gross KL (1998) Species richness in a successional grassland: Effects of nitrogen enrichment and plant litter. *Ecology*, **79**, 2593-2602.
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, *et al.* (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889-892.
- Gaudnik C, Corcket C, Clément B, *et al.* (2011) Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change. *Global change Biology*, **17**, 3351-3365.
- Grime JP (1974) Vegetation classification by reference to strategies. *Nature*, **250**, 26-31.
- Grime JP (1979) *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. Wiley, New-York.
- Grime JP, Fridley JD, Askew AP, Thompson K, Hodgson JG, Bennett CR (2008) Long-term resistance to simulated climate change in an infertile grassland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10028-10032.
- Gross KL, Willig MR, Gough L, Inouye R, Cox SB (2000) Patterns of species density and productivity at different spatial scales in herbaceous plant communities. *Oikos*, **89**, 417-427.
- Hartley SE, Mitchell RJ (2005) Manipulation of nutrients and grazing levels on heather moorland: changes in *Calluna* dominance and consequences for community composition. *Journal of Ecology*, **93**, 990-1004.
- Hautier Y, Niklaus PA, Hector A (2009) Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, **324**, 636-638.
- Hector A, Schmid B, Beierkuhnlein C, *et al.* (1999) Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science*, **286**, 1123-1127.
- Horswill P, O'Sullivan O, Phoenix GK, Lee JA, Leake JR (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **155**, 336-349.
- Huxman TE, Smith MD, Fay PA, *et al.* (2004) Convergence across biomes to a common rain-use efficiency. *Nature*, **429**, 651-654.
- Johnson NC (1993) Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications*, **3**, 749-757.
- Johnson D, Leake JR, Lee JA (1999) The effects of quantity and duration of simulated pollutant nitrogen deposition on root-surface phosphatase activities in calcareous and acid grasslands: a bioassay approach. *New Phytologist*, **141**, 433-442.

- Johnson NC, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen EB (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology*, **84**, 1895-1908.
- Kleijn D, Bekker RM, Bobbink R, De Graaf MCC, Roelofs JGM (2008) In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 680-687.
- Krupa SV (2003) Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, **124**, 179-221.
- MAFF (1986) *The analysis of Agricultural Materials, Third Edition ed.* Her Majesty's Stationary Office, London.
- Majdi H, Ohrvik J (2004) Interactive effects of soil warming and fertilization on root production, mortality, and longevity in a Norway spruce stand in Northern Sweden. *Global Change Biology*, **10**, 182-188.
- Maskell LC, Smart SM, Bullock JM, Thompson K, Stevens CJ (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671-679.
- Mittelbach GG, Steiner CF, Scheiner SM, *et al.* (2001) What is the observed relationship between species richness and productivity? *Ecology*, **82**, 2381-2396.
- Morecroft MD, Sellers EK, Lee JA (1994) An experimental investigation into the effects of atmospheric nitrogen deposition on two semi-natural grasslands. *Journal of Ecology*, **82**, 475-483.
- Oksanen J (1996) Is the humped relationship between species richness and biomass an artefact due to plot size? *Journal of Ecology*, **84**, 293-295.
- Pan YD, Birdsey R, Hom J, McCullough K (2009) Separating effects of changes in atmospheric composition, climate and land-use on carbon sequestration of US Mid-Atlantic temperate forests. *Forest Ecology and Management*, **259**, 151-164.
- Papanikolaou N, Britton AJ, Helliwell RC, Johnson D (2010) Nitrogen deposition, vegetation burning and climate warming act independently on microbial community structure and enzyme activity associated with decomposing litter in low-alpine heath. *Global Change Biology*, **16**, 3120-3132.
- Pearce ISK, van der Wal R (2002) Effects of nitrogen deposition on growth and survival of montane *Racomitrium lanuginosum* heath. *Biological Conservation*, **104**, 83-89.
- Pearson J, Stewart GR (1993) Tansley Review No. 56 : The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, **125**, 283-305.
- Peltzer DA, Wilson SD, Gerry AK (1998) Competition intensity along a productivity gradient in a low-diversity grassland. *American Naturalist*, **151**, 465-476.
- Pennington DD, Collins SL (2007) Response of an aridland ecosystem to interannual climate variability and prolonged drought. *Landscape Ecology*, **22**, 897-910.

- Phoenix GK, Booth RE, Leake JR, Read DJ, Grime JP, Lee JA (2003) Effects of enhanced nitrogen deposition and phosphorus limitation on nitrogen budgets of semi-natural grasslands. *Global Change Biology*, **9**, 1309-1321.
- Pilkington MG, Caporn SJM, Carroll JA, Cresswell N, Lee JA, Reynolds B, Emmett BA (2005) Effects of increased deposition of atmospheric nitrogen on an upland moor: Nitrogen budgets and nutrient accumulation. *Environmental Pollution*, **138**, 473-484.
- Pilkington MG, Caporn SJM, Carroll JA, Cresswell N, Lee JA, Emmett BA, Bagchi R (2007) Phosphorus supply influences heathland responses to atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **148**, 191-200.
- Plassmann K, Edwards-Jones G, Jones MLM (2009) The effects of low levels of nitrogen deposition and grazing on dune grassland. *Science of the Total Environment*, **407**, 1391-1404.
- Power SA, Ashmore MR, Cousins DA, Sheppard LJ (1998) Effects of nitrogen addition on the stress sensitivity of *Calluna vulgaris*. *New Phytologist*, **138**, 663-673.
- Rajaniemi TK (2002) Why does fertilization reduce plant species diversity? Testing three competition-based hypotheses. *Journal of Ecology*, **90**, 316-324.
- Rennenberg H, Dannenmann M, Gessler A, Kreuzwieser J, Simon J, Papen H (2009) Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology*, **11**, 4-23.
- Rich T, Redbane M, Fasham M, McMeechan F, Dobson D (2005) Ground and shrub vegetation In: *Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring* (eds Hill D, Fasham M, Tucker G, Shewry M, Shaw P), pp. 201-222. Cambridge University press, Cambridge.
- Rivas-Goday S, Rivas-Martinez S (1963) Estudio y clasificacion de los pastizales espanoles. *Publication Ministerio de agricultura*, **277**, 269.
- Roem WJ, Klees H, Berendse F (2002) Effects of nutrient addition and acidification on plantspecies diversity and seed germination in heathland. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 937-948.
- Ryan J, Estefan G, Rashid A (2001) *Soil and Plant Analysis Laboratory Manual, Second Edition*. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Schimel JP, Bennett J (2004) Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology*, **85**, 591-602.
- Schwickerath M (1944) Das hohe Venn und seine Randgebiete: Vegetation, Boden, und Landschaft. *Pflanzensoziologie*, **6**, 1-278.
- Sheppard LJ, Leith ID (2002) Effects of NH₃ fumigation on the frost hardiness of *Calluna* - Does N deposition increase winter damage by frost? *Phyton-Annales Rei Botanicae*, **42**, 183-190.
- Sheppard LJ, Leith ID, Crossley A, Van Dijk N, Fowler D, Sutton MA, Woods C (2008) Stress responses of *Calluna vulgaris* to reduced and oxidised N applied under 'real world conditions'. *Environmental Pollution*, **154**, 404-413.

- Sheppard LJ, Leith ID, Mizunuma T, *et al.* (2011) Dry deposition of ammonia gas drives species change faster than wet deposition of ammonium ions: evidence from a long-term field manipulation. *Global Change Biology*, doi 10.1111/j.1365-2486.2011.02478.
- Stevens CJ, Dise NB, Gowing DJ, Mountford JO (2006) Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology*, **12**, 1823-1833.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution*, **158**, 2940-2945.
- Stevens CJ, Duprè C, Gaudnik C, *et al.* (2011a) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207-215.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2011b) The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution*, **159**, 2243-2250.
- Stevens CJ, Manning P, van den Berg LJJ, *et al.* (2011c) Ecosystem responses to reduced and oxidised nitrogen inputs in European terrestrial habitats. *Environmental Pollution*, **159**, 665-676.
- St Clair SB, Sudderth EA, Fischer ML, *et al.* (2009) Soil drying and nitrogen availability modulate carbon and water exchange over a range of annual precipitation totals and grassland vegetation types. *Global Change Biology*, **15**, 3018-3030.
- Suding KN, Collins SL, Gough L, *et al.* (2005) Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4387-4392.
- Sutherland WJ, Armstrong-Brown S, Armsworth PR, *et al.* (2006) The identification of 100 ecological questions of high policy relevance in the UK. *Journal of Applied Ecology*, **43**, 617-627.
- Thayer SS, St Clair SB, Field CB, Somerville SC (2008) Accentuation of phosphorus limitation in *Geranium dissectum* by nitrogen: an ecological genomics study. *Global Change Biology*, **14**, 1877-1890.
- Tilman GD (1984) Plant Dominance Along an Experimental Nutrient Gradient. *Ecology*, **65**, 1445-1453.
- van den Berg LJJ, Dorland E, Vergeer P, Hart MAC, Bobbink R, Roelofs JGM (2005) Decline of acid-sensitive plant species in heathland can be attributed to ammonium toxicity in combination with low pH. *New Phytologist*, **166**, 551-564.
- van den Berg LJJ, Peters CJH, Ashmore MR, Roelofs JGM (2008) Reduced nitrogen has a greater effect than oxidised nitrogen on dry heathland vegetation. *Environmental Pollution*, **154**, 359-369.
- Vergeer P, Berg LLJvd, Bulling MT, Ashmore MR, Kunin WE (2008) Geographical variation in the response to nitrogen deposition in *Arabidopsis lyrata petraea*. *New Phytologist*, **179**, 129-141.
- Vermeer JG (1986) The effect of nutrients on shoot biomass and species composition of wetland and hayfield communities *Acta Oecologica-Oecologia Plantarum*, **7**, 31-41.

- Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry*, **13**, 87-115.
- Wamelink GWW, van Dobben HF, Berendse F (2009) Vegetation succession as affected by decreasing nitrogen deposition, soil characteristics and site management: A modelling approach. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1762-1773.
- Wedin D, Tilman D (1993) Competition among grasses along a nitrogen gradient: initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs*, **63**, 199-229.
- Wilson SD, Tilman D (1991) Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. *Ecology*, **72**, 1050-1065.
- Wilson SD, Tilman D (1993) Plant competition and resource availability in response to disturbance and fertilization. *Ecology*, **74**, 599-611.
- Wilson EJ, Wells TCE, Sparks TH (1995) Are calcareous grasslands in the UK under threat from nitrogen deposition - An experimental-determination of a critical load. *Journal of Ecology*, **83**, 823-832.
- European Mapping and Emissions Programme (EMEP) available at: www.emep.int. This site contains yearly model results of nitrogen deposition for the whole EMEP grid for the years 2004-2006.

Gradient of Management intensity (MI)



MI3



MI2



MI1

Acid grasslands in Gironde along a gradient of management intensity (MI) with from bottom to the top, sites with intensive (MI1), intermediate (MI2) and extensive management (MI3).

CHAPITRE 4

CONSERVATION ET RESTAURATION POTENTIELLE DES PRAIRIES ACIDES

ETUDE DES BANQUES DE GRAINES

La potentille retrouvée ?

Article 6 **Persistent and transient seed banks in acid grasslands along a gradient of management intensity: conservation values and restoration perspectives**

Cassandre Gaudnik, Emmanuel Corcket and Didier Alard

(In preparation for Journal of Applied Ecology)

Persistent and transient seed banks in acid grasslands along a gradient of management intensity: conservation values and restoration perspectives

Cassandre Gaudnik, Emmanuel Corcket and Didier Alard

Abstract

1. In a context of global change, especially nitrogen deposition, plant species characteristic of nutrient-poor acid grasslands have become rare. Habitats restoration often fails to enhance the characteristics species which is partly caused by a lack of plant species colonization. Then, soil seed banks represent a pool of species although their relative importance as well as their relationship with management remain unclear. We asked in which way management practices affect the species composition between established vegetation and seed banks, and whether the seed banks composition constrained the conservation of characteristic species, necessary to the success of habitat restoration.

2. We compiled a data set including records of established vegetation with the associated transient and persistent seed banks along a management intensity gradient. We sampled sites traditionally managed belonging to *Agrostion curtisii* acid grasslands as reference habitat (n = 3). Extensively (n = 3) and intensively (n = 4) managed grasslands sites of the same potential habitat were considered.

3. The extensively managed sites were floristically and environmentally closer to the traditional acid grasslands than the intensively managed sites. Management intensification favoured plant species of nutrient-rich conditions with annual species characterised by high and instantaneous need in nutrients for growth.

4. In traditional acid grasslands, the species composition between established vegetation and transient seed bank were significantly different, but not when considering persistent seed bank. On the contrary, in the disturbed sites, established vegetation was more similar to their associated seed banks. No characteristic species of the reference habitat was found among indicators species of the transient and persistent seed banks.

5. High dissimilarity in established vegetation and persistent seed bank may explain the small contribution of the soil seed bank in acid grasslands conservation. The unlikely restoration by seed bank calls for other options like the reintroduction of characteristic species by sowing, particularly in extensive sites which seem better candidates than intensive sites.

Keywords: acid grasslands, conservation, management intensity, permanent seed bank, restoration, species composition, transient seed bank

Introduction

Acid grasslands are semi-natural habitats tightly related to human management, especially grazing and hay-cutting. On acid and nutrient-poor soils, grasslands remain nitrogen (N) limited since nutrients removed by herbivory or mowing are greater than those returning to the soil by animal excrements or fertilizer making (Vitousek & Howarth, 1991). These conditions create suitable and often exclusive habitats for a range of characteristic plant species adapted to these stressful conditions, leading to habitats of high conservation interest. Acid grasslands were once common throughout the Atlantic regions of Western Europe (Webb, 1998) but they have declined both in area and in quality during recent years (Haines-Young *et al.*, 2003). The causes of the decline are the conversion to more productive types of agricultural land use or abandonment of management practices (Webb, 1998; Vandvik *et al.*, 2005) and eutrophication through fertilizer application and atmospheric N deposition (Bobbink *et al.*, 2010; Duprè *et al.*, 2010; Stevens *et al.*, 2010). Concerning changes in use-land, intensification with over-grazed grasslands and under-management with scrub encroachment induce unfavourable conditions. Concerning nutrient enrichment, the impacts of atmospheric N deposition on grasslands, through soil-mediated effects, are well studied (Gaudnik *et al.*, 2011; Stevens *et al.*, 2011a), but the extent to which the composition of grasslands is indirectly affected by the soil seed bank remains unresolved. Enhanced N levels represent a particular threat to temperate semi-natural or unimproved vegetation types. Oligotrophic ecosystems are especially at risk because many characteristic species are adapted to nutrient-poor conditions and are outcompeted by species with higher N demands (Wedin & Tilman, 1993; Hautier *et al.*, 2009). Future recovery of damaged habitats may not be possible without active management and restoration measures (Wamelink *et al.*, 2009). As a result, acid grasslands are now considered as habitat of priority interest for the Natura 2000 network under the Habitats Directive (Flora directive 92/43/EEC) whose conservation requires specific management regime (Bensettiti *et al.*, 2005).

Conservation policies allowed to restore habitats from ex-agricultural land (Walker *et al.*, 2004a). Despite the return to extensive traditional management and restoration measures through removal of the nutrient rich topsoil, characteristic species of grasslands often fail to establish or increase in population size (Walker *et al.*, 2004b). This may be related in part to conservation management that fails to restore the biogeochemical conditions suited to the characteristic plant species adapted to acid nutrient-poor habitat. Indeed, the soil in these habitats has a low buffer capacity making them particularly vulnerable to change in soil chemistry. Besides, characteristic species have narrower ecological amplitude than common species for soil biogeochemical parameters (Kleijn *et al.*, 2008). The failure of restoration projects could be attributed to the sensitivity of characteristic species to N availability (Bobbink, 1991), acidification (Maskell *et al.*, 2010), high soil ammonium/nitrate ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) ratios (Stevens *et al.*, 2011b), high soil ammonium (NH_4^+) concentrations (van den Berg *et al.*, 2005) and high soil toxic metals (Al^{3+}) concentrations present in acid habitats (Roem *et*

al., 2002). But, it may also be related in part to the poor dispersal ability and short seed longevity of the more endangered grasslands species (van Duren *et al.*, 1998; Matus *et al.*, 2003). In the context of habitat loss and fragmentation, grassland re-establishment is usually seed-limited (Poschlod *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2003). Characteristic species will fail to colonize sites when they have disappeared from the seed bank and when the nearest source population is beyond dispersal range.

The accumulation and persistence of viable seeds in the soil of arable fields and pasture of most temperate habitats have been recognized for a long time as soil seed bank (Thompson & Grime, 1979). Such seed bank may be classified in transient seed bank, with viable seed persisting for less than one year, and in persistent seed bank which viable seeds persist at least for one year in soil (Bakker *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1997). Seed banks may reflect former established vegetation, independently on the present species occurring in the community. Thus, species composition of soil seed bank may be very different from the vegetation (Kirkham & Kent, 1997; Akinola *et al.*, 1998) though established vegetation and its associated seed bank is the most similar in grasslands (Hopfensperger, 2007; Bossuyt, 2008). Although many studies have concluded that the potential contribution of the soil seed bank to grasslands restoration is low, due to the absence of persistent seeds in soil (Dutoit & Alard, 1995; Rosén & van der Maarel, 2000; Chabrerie *et al.*, 2002; Kalamees & Zobel, 2002; Valko *et al.*, 2011), there are still uncertainties in the way of how the persistent component of seed bank is assessed and the role of grassland management. For example, community stability is expected to decrease the similarity between seed banks and vegetation in grasslands (Hopfensperger, 2007), due to a lack of disturbances creating sites for germination from the seed (Bekker *et al.*, 1997; Mitlacher *et al.*, 2002), while studies performed in open grasslands and disturbed sites have revealed high similarities between seed bank and vegetation (Milberg, 1995; Matus *et al.*, 2005). In the context of changes in land use, the contribution of soil seed banks in nature conservation and restoration has therefore to be carefully evaluated.

In this paper, we are concerned with the pattern of variations in soil seed banks along a management intensity gradient, taking into account the persistent or transient type. We explored their similarities with associated vegetation and the way in which the conservation of characteristic species is constrained by the seed bank composition. The following research questions are addressed:

1. Are there differences in species composition between the transient and persistent seed banks in acid grasslands? If yes, do these differences remain identical along a management intensity gradient?
2. What is the conservation value of species pool found in the transient and persistent seed bank? Could we assess the feasibility of restoring acid grasslands vegetation from seeds already present in the soil seed banks?

Materials and methods

Studied sites

The study was carried out in South-western France near Bordeaux in a homogeneous area considering climate, with high mean annual precipitations of 885 mm and warm mean annual temperature of 12.5°C (INRA station 2007-2010), flat topography and sandstone bedrock. Ten acid grasslands were selected along a management intensity (MI) gradient including three levels: extensive cutting, *i.e.* less than once per year (MI1), intermediate cutting, *i.e.* one or two cutting(s) per year (MI2) and intensive grazing or cutting (MI3) (Table 4.1). The MI2 grasslands represent the “traditional managed grasslands” with extensive mowing necessary to maintain the “reference habitat”: *Agrostion curtisii* grasslands. It is the vicarious eu-atlantic alliance (De Foucault, 1986) of *Violion caninae* alliance (Schwickerath, 1944) belonging to the phytosociological *Nardetea strictae* class (Rivas-Goday & Rivas-Martinez, 1963). The selection was performed to provide different geographic locations in these study area where in one location the three levels of management intensity could be found closely to each other to avoid other confounding variables.

Table 4.1. Description of all the sampled sites according to their location name, their geographical coordinates, their indicator species and their management intensity (MI). Mean geographical coordinates of all replicates for each site were given for latitude and longitude. Indicator species according the statistical IndVal method were given for the first five indicator species only and the characteristic species of the reference habitat are represented in bold. Management intensity was indicated with the level 1: extensive cutting, 2: intermediate cutting and 3: intensive cutting.

Site	Location	Latitude/Longitude (decimal degrees)	Indicator Species	MI
1	Léognan	45.72/-2.90	<i>Carum verticillatum</i> , <i>Centaurium erythraea</i> , <i>Hypericum pulchrum</i> , <i>Serratula tinctoria</i> , <i>Simethis mattiazzi</i>	2
2	Léognan	45.62/-0.90	<i>Anthemis nobilis</i> , <i>Erica tetralix</i> , <i>Pedicularis sylvatica</i> , <i>Saponaria officinalis</i> , <i>Verbena officinalis</i>	3
3	Léognan	44.83/-1.33	<i>Betula pubescens</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Salix caprea</i> , <i>Sonchus arvensis</i>	1
4	Le Barp	47.31/-2.76	<i>Carex hirta</i> , <i>Linum bienne</i> , <i>Petrorhagia prolifera</i> , <i>Pteridium aquilinum</i> , <i>Sanguisorba minor</i>	2
5	Mios	46.59/-1.83	<i>Hedera helix</i> , <i>Quercus pyrenaica</i> , <i>Trifolium campestre</i> , <i>Trifolium fragiferum</i> , <i>Veronica arvensis</i>	3
6	Le Barp	45.67/-2.87	<i>Carex pilulifera</i> , <i>Halimium alyssoides</i> , <i>Hieracium pilosella</i> , <i>Jasione montana</i> , <i>Thymus pulegioides</i>	1
7	Gujan-Mestras	46.33/-1.82	<i>Erica ciliaris</i> , <i>Galium verum</i> , <i>Polygala serpyllifolia</i> , <i>Polygala vulgaris</i> , <i>Viola canina</i>	2
8	Gujan-Mestras	45.09/-2.25	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Festuca pratensis</i> , <i>Geranium molle</i> , <i>Rorippa sylvestris</i> , <i>Rumex pulcher</i>	3
9	La-Teste-de-Buch	45.83/-2.67	<i>Lonicera periclymenum</i> , <i>Pseudarrhenatherum longifolium</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Teucrium scorodonia</i> , <i>Tuberaria guttata</i>	1
10	Pessac	45.05/-2.46	<i>Anagallis arvensis</i> , <i>Centaurium pulchellum</i> , <i>Hypochaeris glabra</i> , <i>Paspalum dilatatum</i> , <i>Vulpia bromoides</i>	3

Vegetation records

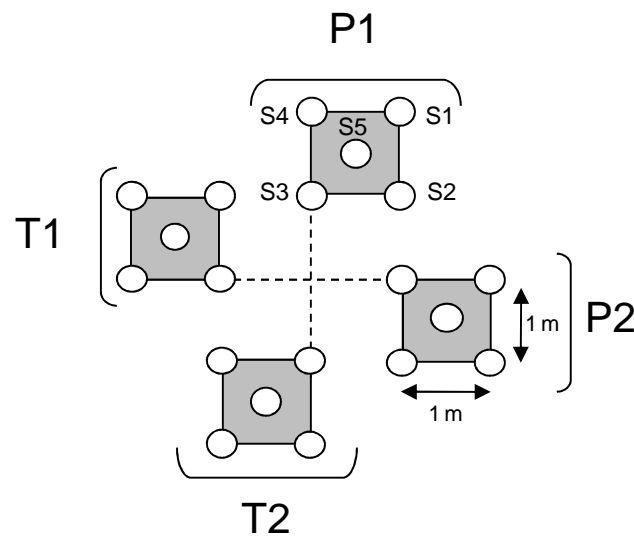
Vegetation composition of these ten sites was recorded at the end of June 2009. Four 1×1 m plots were randomly replicated three times over each site (Figure 4.1). All vascular plants were identified to the species level, following Flora Europaea (1964) and their cover was estimated using the Domin scale (Rich *et al.*, 2005).

Besides, former vegetation records of *Agrostion curtisii* grasslands carried out during the spring of 2007 (Gaudnik *et al.*, 2011) were used to provide a regional reference for comparison with the grasslands of our MI gradient.

Soil seed bank

Soils cores were sampled in each of the ten sites of the MI gradient in early March, early June, late July and early October 2009 (Figure 4.1). Data derived from seasonal sampling can allocate species to one of the transient or persistent longevity type (Thompson *et al.*, 1997, 1998). So, soil cores sampled in June and July 2009 were assumed to reflect the persistent seed bank, respectively P1 and P2, because seeds originating from the previous growing season should already have germinated, while the season's seed rain in summer should not yet have started (Edward & Crawley, 1999). Besides, soil cores sampled in March and September 2009 were reflected the transient seed bank, respectively T1 and T2, *i.e.* seed persisting less than one year, including seeds from the previous and the current year seed rain that have not germinated yet (Thompson *et al.*, 1997). Five cores of 10 cm thick layers and 6.5 cm diameter (*i.e.* 332 cm³) were sampled at each period in each plot of the ten sites (Figure 4.1) and were air-dried. Then, each soil sample was spread in a plastic tray, filled with stones and sterilized sand, and installed in a culture chamber with appropriate lighting and watered regularly. Emergent seedlings were identified (Muller, 1978) and removed after counting or replanted for later identification (Fournier, 2000). About two months after, each sampling was sprayed with gibberellic acid (1g.L⁻¹), following the method of Barralis and Chadoeuf (1987). Before the start of the second germination period which lasted several weeks, the soil was thoroughly stirred because mixing is known to cause more seeds to germinate (Roberts, 1981). To reach a minimum soil volume to recover most of the species in grasslands seed banks (Roberts, 1981), the seedlings from all samples of each site were considered according to the period sampling that distinguished the transient seed bank (n = 30) and the persistent seed bank (n = 30).

Figure 4.1. Representation of the soil seed banks sampling design of one replicate in a sampling site with the four plots of 1×1 m for each period of sampling: persistent seed bank sampling in June (P1) and in July (P2) and transient seed bank sampling in March (T1) and October (T2) and the five soil cores sampled in each plot (S1 to S5).



Data analysis

A hierarchical clustering analysis was performed on the complete dataset of the vegetation records ($n = 21$), including the records of 2007 ($n = 11$) and 2009 ($n = 10$). “Indicator species” were identified both for the clusters described and the MI gradient with IndVal method which uses the specialization and the occurrence of the species in the dataset (Dufrene & Legendre, 1997). Moreover, the “characteristics species” of the *Agrostion curtisii* grasslands, as the reference habitat, are highlighted according to the French (Habitat 6230, Benstetiti *et al.*, 2005) and European classifications (EUNIS 1.7, Davies *et al.*, 2004). So, the “indicator species”, given with statistical method, are distinguished to the “characterized species”, defined as typical species in the classifications of reference habitat.

To investigate environmental conditions, an ecological method was based on floristic records and the Ellenberg indicator database adapted to Atlantic regions (Hill *et al.*, 1999). The Ellenberg indicators characterize species habitat preferences with regard to nitrogen and nutrient availability more broadly (Ellenberg N), soil pH (Ellenberg R), soil moisture (Ellenberg F) and light availability (Ellenberg L). For field vegetation data recorded in 2009, a cover-weighted mean Ellenberg index across each plant community site was calculated as $cwmEllenberg = \sum_i p_i \times Ellenberg_i$ where p_i was the relative cover of the i species, given with the Domin scale, and $Ellenberg_i$ was the Ellenberg indicator value of the i species. Species not available in the Ellenberg database established by Hill *et al.*, 1999 were excluded from the calculation.

A first nonmetric multidimensional scaling was performed on the complete dataset of vegetation records to plot the vegetation data considering the MI level (NMDS_{Vg}; $n = 21$).

The vegetation records coordinates along NMDS_{Vg} axes were correlated with Ellenberg's indicator values, using a Spearman rank coefficient correlation, to assess ecological gradient in NMDS_{Vg}. Then, a second nonmetric multidimensional scaling was carried out to plot the vegetation data and both the transient and persistent seed banks data (NMDS_{VgSB}; n = 30). NMDS_{VgSB} allowed comparisons between the species in established vegetation and the species in the soil seed banks, according to the MI gradient. NMDS is a nonparametric ordination method that is considered well suited for ecological data as it performs well on data non-normal or otherwise unorthodox scales (Kendel & Orloci 1986; McCune & Grace 2002). NMDS is a reduced-space ordination method that placed samples in dimensional space (k = 2 or k = 3) to minimize stress, *i.e.* difference between rank order dissimilarities and rank order euclidean distance in ordination space. Only the first two axes of the NMDS_{Vg} and NMDS_{VgSB} were represented but the final solutions were three dimensional as they were less stressed than the solutions with two dimensions. All ordinations were run using Vegan package in R 2.13.0.

Variability in species composition in the established vegetation and in the transient and the persistent seed banks was estimated as the average of Bray-Curtis dissimilarity among sites within each MI level. Indicator species were identified with the statistical IndVal method, considering on one hand the established vegetation and the seed banks data and on the other hand all the type of records according to the MI gradient.

Data and residuals distribution were checked for normality with the Shapiro-Wilk test and constancy of variance was tested with the Bartlett's test. Variation in Ellenberg's indicator values were tested according to the management intensity using General Linear Model (GLM). GLM was also used to test the variation in Bray-Curtis dissimilarity according to the MI gradient and the type of records (vegetation vs seed banks data). Then, significant differences were assessed using Tukey's HSD multiple comparison test. All analyses were conducted using R (R.2.13.0; R foundation for statistical computing, Vienne, Austria).

Results

Vegetation along the management intensity gradient

The hierarchical cluster analysis on the complete dataset of vegetation records (n = 21) discriminated, on the basis of their floristic composition, two main clusters corresponding to two Community Types *sensus* Gaudnik *et al.*, (2011) (Table 4.2). All the sites of the MI gradient recorded in 2009 were related to the *Simethi planifoliae-Pseudarrhenatherum longifolii* association located in North Aquitaine. However the analysis showed no clear cluster related to the MI levels.

Table 4.2 Indicator species with IndVal method of the complete dataset of vegetation records, included sites sampled in 2007 and 2009 (n = 21). Only significant indicator species were given according to location, phytosociological association, management intensity (MI) gradient with 1: extensive cutting, 2: intermediate cutting and 3: intensive cutting, and the number of vegetation records in 2009 and 2007 (n_{2009/2007}). Species represented in bold are defined as characteristic species of the *Agrostion curtisii* grasslands.

Location	Phytosociological association	Indicator species	MI	n _{2009/2007}
South Aquitaine	<i>Carici piluliferae-Pseudarrhenatherum longifolii</i>	<i>Avenula lodunensis</i> , <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Erica vagans</i> , <i>Hieracium pilosella</i> , <i>Hypericum pulchrum</i> , <i>Lathyrus linifolius ssp. montanus</i> , <i>Potentilla erecta</i> , <i>Pteridium aquilinum</i> , <i>Polygala serpyllifolia</i> , <i>Ranunculus tuberosus</i> , <i>Stachys officinalis</i> , <i>Veronica</i>	2	0/6
North Aquitaine	<i>Simethi planifoliae-Pseudarrhenatherum longifolii</i>	<i>Anthoxanthum odoratum</i> , <i>Carex arenaria</i> , <i>Erica cinerea</i> , <i>Jasione montana</i> , <i>Rubus fruticosus</i> , <i>Rumex acetosella</i> , <i>Tuberaria guttata</i> , <i>Ulex europaeus</i>	1	3/0
		<i>Danthonia decumbens</i> , <i>Polygala vulgaris</i>	2	3/5
		<i>Anagallis arvensis</i> , <i>Bellis perennis</i> , <i>Crepis capillaris</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Leontodon hispidus</i> , <i>Poa annua</i> , <i>Trifolium</i>	3	4/0

Indicator species of the MI2 or MI1 grasslands like *Danthonia decumbens*, *Polygala serpyllifolia*, and *Potentilla erecta* corresponded to some characteristic species of the species rich *Agrostion curtisii* grasslands whereas none of these characteristic species were found in the MI3 grasslands. The variation in Ellenberg’s indicator values showed no significant differences in soil fertility, pH and moisture along the MI gradient (Figure 4.2). Only the light availability indicator values changed significantly, with lower light availability in the MI1 grasslands.

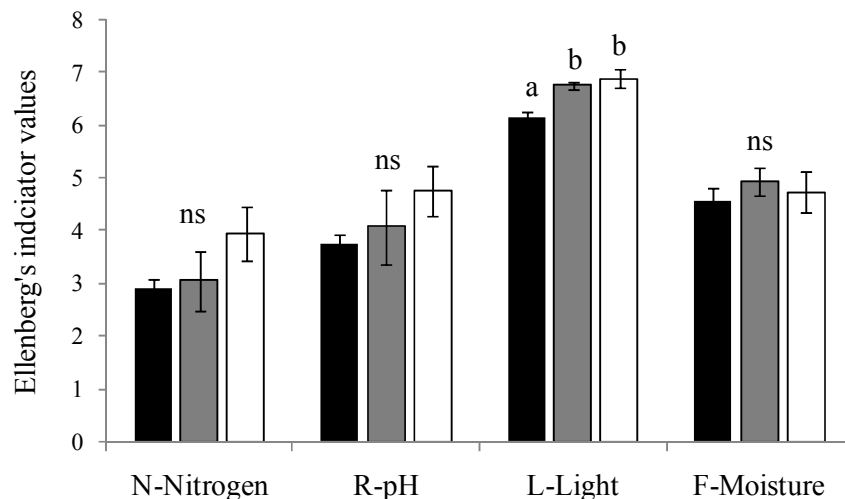


Figure 4.2. Variation in mean Ellenberg’s indicator values, N-Nitrogen (soil fertility); R-Reaction (pH); L-Light and F-Moisture for vegetation records of 2009 (n = 10) according to the management intensity (MI) gradient, MI1: extensive cutting (black bars); MI2: intermediate cutting (grey bars); MI3: intensive cutting (white bars). Ellenberg’s indicators values were calculated as the weighted mean of the three replicates for each site over all species. Effect of management intensity on means ± standard error was tested with GLM analysis ($P < 0.05$, ns: not significant) followed with Tukey’s HSD multiple comparison test summarised above the bars with bars sharing a letter not significantly different ($P < 0.05$).

Vegetation records of 2007 and 2009 were plotted in the NMDS_{Vg} ordination (21 records × 174 species) to provide a general overview of the species composition for all sampled sites (Figure 4.3). The MI2 *Agrostion curtisii* grasslands sampled in 2009 in this study presented a relative floristic similarity with the regional reference defined in previous records of 2007 (Gaudnik *et al.*, 2011). Species accounting for floristic gradients were for axis 1: *Campanula rotundifolia*, *Carex panicea* and *Euphorbia dulcis* at the negative end of the axis, opposed to *Geranium molle*, *Rumex pulcher* and *Rorippa sylvestris* at the positive end. Vegetation changes due to the MI gradient were clearly expressed along axis 1 which opposed the MI2 grasslands with perennial species to the MI3 grasslands with annual species. For axis 2, species accounting for floristic gradients were: *Betula pubescens*, *Lonicera periclymenum* and *Salix caprea* at the negative end of the axis, opposed to *Anagallis arvensis*, *Centaureum pulchellum* and *Vicia sativa* at the positive end. The MI gradient was to a lesser extent ordered along axis 2 from the MI1 grasslands with woody species opposed to the MI3 grasslands with annual species.

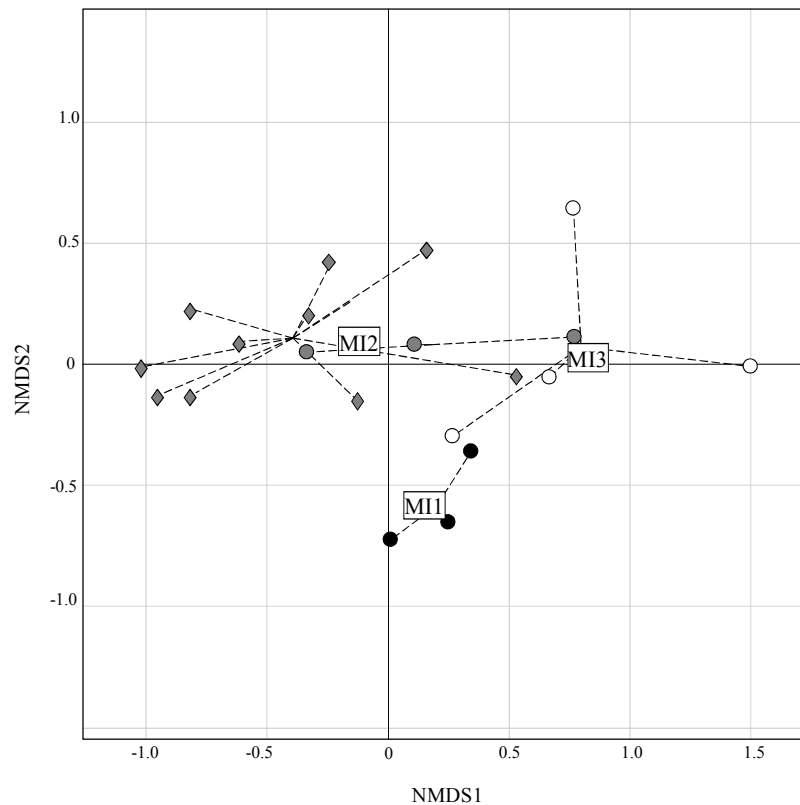


Figure 4.3. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS_{Vg}) ordination diagram of vegetation records sampled in 2007 and 2009 (21 records x 174 species) along axes 1 and 2. Distribution of vegetation records was represented according the management intensity (MI) gradient: MI1: extensive cutting (black); MI2: intermediate cutting (grey); MI3: intensive cutting (white) with the barycenter of each management intensity represented. For MI2, vegetation records were contained for sampling in 2007 (diamond) and 2009 (circle). The final stress and instability were 9.08 and <0.0000 respectively.

Examining correlations existing between NMDS_{Vg} axes coordinates and Ellenberg's indicator values of sites provided hypotheses for the ecological gradient besides species composition

variations (Table 4.3). Axis 1 was positively related to soil fertility ($r = 0.91$, $P < 0.0001$), pH ($r = 0.89$, $P < 0.0001$) and light availability ($r = 0.72$, $P = 0.0003$). At the negative end, the most oligotrophic and acid grasslands (MI2) were opposed to the most intensive sites (MI3), which are both nutrient-rich due to fertilization and lit places due to the short vegetation induced by frequent defoliations. On the contrary, there was no correlation between coordinates of records along axis 2 and mean Ellenberg's indicators values of their vegetation.

Table 4.3 Correlations between the coordinates of vegetation records ($n = 21$) along the two axes of the NMDS_{Vg} and Ellenberg's indicator values calculated for all samples in 2007 and 2009: N-Nitrogen (soil fertility); R-Reaction (pH); L-Light and F-Moisture. Ellenberg's indicator values were calculated as the weighted mean over all cover species for each record. For each axis, r spearman rank correlation index was given as well as the significance of the correlation: *** $P < 0.001$; ** = $P < 0.01$; * = $P < 0.05$; (*) = $P < 0.1$ and ns: not significant.

Parameters	r with significance		
	Axis 1	Axis 2	Axis 3
N-Nitrogen	+0.91 ***	+0.07 ns	-0.11 ns
R-pH	+0.89 ***	+0.12 ns	-0.17 ns
L-Light	+0.72 ***	+0.21 ns	+0.09 ns
F-Moisture	+0.08 ns	-0.09 ns	-0.28 ns

Vegetation and soil seed banks

All the type of records sampled in 2009, including vegetation, transient and persistent seed banks records, were plotted in the $\text{NMDS}_{\text{VgSB}}$ ordination (30 records \times 148 species) (Figure 4.4). A complete list of species sampled in these records is presented in Appendix 1.

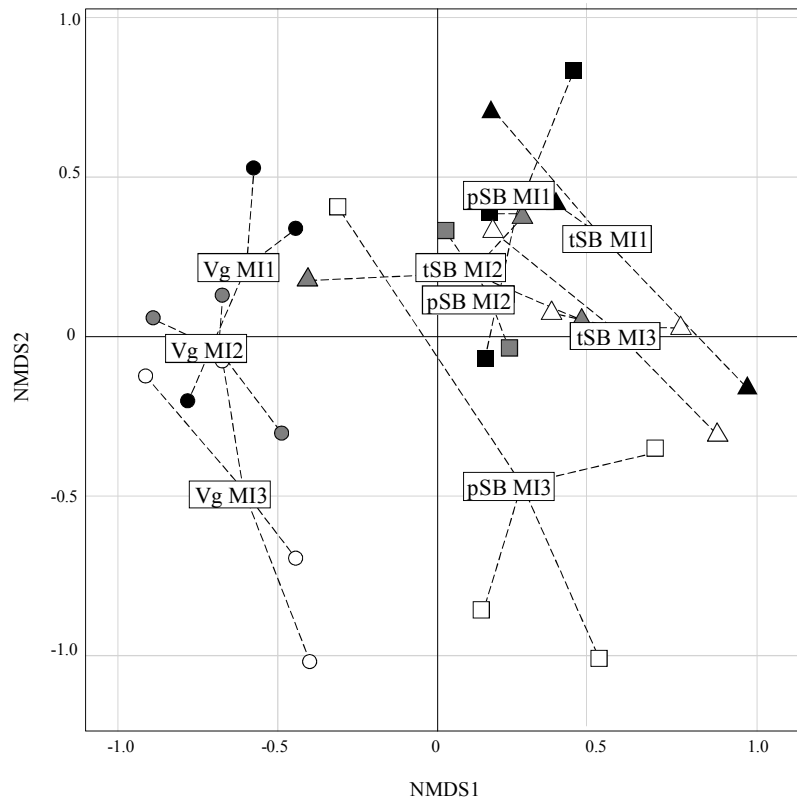


Figure 4.4. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS_{VgSB}) ordination diagram of the vegetation records, the transient and persistent seed banks records (30 records x 148 species) along axes 1 and 2. Distribution of vegetation records (circle), transient seed bank records (triangle) and persistent seed bank records (square) are represented with the barycenter of each management intensity (MI) level and each type of record coded as MI1: extensive cutting (black); MI2: intermediate cutting (grey); MI3: intensive cutting (white). Vg, tSB and pSB indicated respectively records of Vegetation, transient Seed Bank and persistent Seed Bank. The final stress and instability were 13.63 and 0.0003 respectively.

Species accounting for ordination gradients were respectively for axis 1: *Anthemis nobilis*, *Erica tetralix* and *Pedicularis sylvatica* at the negative end of the axis, opposed to *Chenopodium album*, *Cirsium arvensis* and *Radiolas linoides* at the positive end. For axis 2: *Festuca pratensis*, *Rumex pulcher* and *Rorippa sylvestris* at the negative end of the axis, are opposed to *Capsella burso pastoris*, *Lonicera periclymenum* and *Teucrium scorodonia* at the positive end. Axis 1 opposed present vegetation records at the negative end of the axis and seed banks records at the positive end, underlining their floristic differences. Axis 2 was negatively related to the management intensity gradient regardless of the type of records (Vg, tSB, pSB). Variability in species composition within each type of records (Vg, tSB or pSB) along the MI gradient was not significantly different (Figure 4.5).

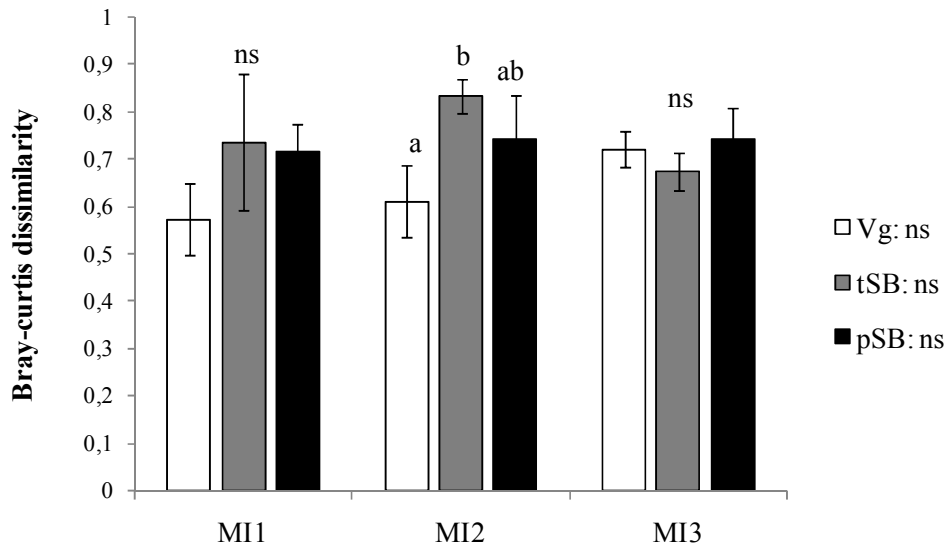


Figure 4.5. Bray-curtis dissimilarity between sampled sites according to the management intensity (MI) gradient, MI1: extensive cutting; MI2: intermediate cutting; 3: intensive cutting. Means \pm standard errors were calculated for vegetation records (Vg) (white bars), transient seed bank records (tSB) (grey bars) and persistent seed bank records (pSB) (black bars). Effect of management intensity and effect of the type of records (vegetation vs seed banks data) were tested with GLM analysis ($P < 0.05$, ns: not significant) followed with Tukey's HSD multiple comparison test summarised above the bars with bars sharing a letter not significantly different ($P < 0.05$).

Variability in species composition according to the type of record appeared in MI2 grasslands only. Species composition in the established vegetation was very different to the one in the transient seed bank. Moreover, the number of indicator species was higher in the vegetation records than in the transient or in the persistent seed banks records (Table 4.4). Indicator species in vegetation records were perennials species with some characteristic species of the traditional MI2 grasslands like *Agrostis capillaris* and *Calluna vulgaris*. Both transient and persistent seed banks records did not contained characteristic species of the traditional acid grasslands. Seed banks indicator species were predominantly annual species like *Stellaria media* and *Poa annua* in persistent seed banks and *Juncus bufonius* in transient seed banks.

Table 4.4 Indicator species (Ind species) with indicator values (Ind val) and significance for all the MI levels according to the type of records sampled in 2009 (n = 30): established vegetation, persistent and transient seed banks records. The characteristic species of the traditional acid grasslands were represented in bold. The most important indicator species in each type (indval \geq 0.5) are represented in bold with significance for indicator value: *** = P<0.001; ** = P<0.01; * = P<0.05; (*) = P<0.1 and ns: not significant.

Established vegetation		Transient seed bank		Persistent seed bank	
Ind species	Ind val	Ind species	Ind val	Ind species	Ind val
<i>Agrostis capillaris</i>	0.56 *	<i>Juncus bufonius</i>	0.62 **	<i>Poa annua</i>	0.45 *
<i>Agrostis curtisii</i>	0.40 *	<i>Juncus effusus</i>	0.54 **	<i>Poa pratensis</i>	0.67 **
<i>Calluna vulgaris</i>	0.50 *	<i>Leontodon saxatilis</i>	0.40 *	<i>Stellaria media</i>	0.50 **
<i>Carex binervis</i>	0.37 *	<i>Veronica arvensis</i>	0.42 *	<i>Veronica persica</i>	0.39 *
<i>Hieracium pilosella</i>	0.43 *				
<i>Holcus lanatus</i>	0.60 *				
<i>Hypochaeris radicata</i>	0.94 **				
<i>Leontodon hispidus</i>	0.70 **				
<i>Molina caerulea</i>	0.36 *				
<i>Prunella vulgaris</i>	0.47 **				
<i>Rubus fruticosus</i>	0.47 *				
<i>Ulex europaeus</i>	0.49 **				
<i>Ulex minor</i>	0.40 *				
<i>Veronica officinalis</i>	0.40 *				

The indicator species according to the MI gradient for all records were different from those found according to the type of records (Table 4.5). However, *Veronica persica* was found as an indicator species of both the persistent seed bank and the MI3 grasslands. MI2 grasslands were related to *Pseudarrhenatherum longifolium*, characteristic of the traditional acid grasslands and especially of the *Agrostion curtisii* grasslands sampled in this study. MI1 grasslands were defined by species like *Anthoxanthum odoratum* and *Carex arenaria*, and were floristically close to the MI2 grasslands. Intensively managed MI3 grasslands were determined by annual species like *Anagallis arvensis*, *Aphanes arvensis*, *Cerastium fontanum* and *Veronica persica*. *Anagallis arvensis* was already found as indicator species of the vegetation records for the MI3 level (Table 4.2).

Table 4.5 Indicator species (Ind species) with indicator values (Ind val) and significance for all the type of records sampled in 2009 (n = 30) according to the management intensity (MI) gradient, MI1: extensive cutting; MI2: intermediate cutting; MI3: intensive cutting. The characteristic species of the traditional acid grasslands are presented in bold. The most important indicator species in each type (indval \geq 0.5) are represented in bold with significance for indicator value: *** = P<0.001; ** = P<0.01; * = P<0.05; (*) = P<0.1 and ns: not significant.

MI 1		MI 2		MI 3	
Ind species	Ind val	Ind species	Ind val	Ind species	Ind val
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	0.58 *	<i>Achillea millefolium</i>	0.59 *	<i>Anagallis arvensis</i>	0.68 **
<i>Carex arenaria</i>	0.45 *	<i>Leucanthemum vulgare</i>	0.57 **	<i>Aphanes arvensis</i>	0.42 *
<i>Erica cinerea</i>	0.44 *	<i>Pseudarrhenatherum longifolium</i>	0.54 *	<i>Cardamine pratensis</i>	0.48 *
<i>Rumex acetosella</i>	0.55 *			<i>Cerastium fontanum</i>	0.59 **
<i>Tuberaria guttata</i>	0.34 *			<i>Ranunculus repens</i>	0.37 *
				<i>Trifolium repens</i>	0.75 **
				<i>Veronica persica</i>	0.40 *

Discussion

None of the species included in this study are endemic or rare in nature. However, large-scale habitat destruction and changes in environmental conditions can explain that some species have become rarer in the remaining acid grasslands whereas others remained fairly common. The comparison of established vegetation and seed banks along a management intensity gradient suggests that high dissimilarity in their species composition of the traditional grasslands and the absence of characteristic species as indicator species of the seed banks may have played a role in the decline of characteristic species of acid grasslands in some countries.

Vegetation along the management intensity gradient

Along the management intensity gradient, light availability expressed as Ellenberg indicator values decreased from the extensive and traditional grasslands to the more intensively managed grasslands. The non-significance of external factors such as soil moisture (Ellenberg F indicator value) suggests that management is the determinant factor between sites above other environmental conditions. The extensive sites appear not only environmentally, but also floristically, the most similar to the traditional grasslands, with the presence of characteristic species such as *Carex arenaria*, *Polygala serpyllifolia* and *Potentilla erecta*, indicator species of extensive or traditional sites and known as rare species in some countries. However, the traditional grasslands have the highest number of species compared to the extensive sites and the intensive sites. Intensive management is a threat for floristic conservation value of acid grasslands, with *Bellis perennis*, *Poa annua*, *Trifolium repens* as characteristic species. Then, intensively managed sites (MI3) are not associated to characteristic species of acid grasslands, and have less species than the traditionally managed grasslands (Reiné *et al.*, 2004). Indeed, management intensification significantly favours plant species of nutrient rich conditions, estimated with Ellenberg N indicator, and high nutrient availability is known to reduce plant species richness (Bobbink, 1991; Kleijn *et al.*, 2008).

Differences between transient and persistent seed banks in the management intensity gradient

Many studies of European semi-natural grasslands have reported fairly small and species-poor soil seed banks, containing a negligible share of characteristic grassland species (Akinola *et al.*, 1998; Rosén & van der Maarel, 2000; Kalamees & Zobel, 2002; Valkó *et al.*, 2011). However, as a consequence of their sampling time, these studies have considered only the transient seed bank from the previous or the same year. Indeed, the seeds surviving until the second germination season should be classified as persistent seeds in the soil seed bank (Thompson *et al.*, 1997, 1998). To assess the persistent seed bank only, sampling should be run in summer, when spring germination is complete and dispersion of fresh seeds set is starting. Conversely, sampling outside this period can provide information on the transient seed bank only. The sampling of this study, that distinguishes the transient from the persistent

fraction of the seed bank on the basis of seasonal sampling during one year, contrasts with previous studies that considered the seed banks according to the vertical distribution in the soil only (Bekker *et al.*, 1998). Because older seeds have more time to become deeply buried, depth distribution is often a reasonably good indicator of seed longevity (Thompson *et al.*, 1997; Bekker *et al.*, 1998). But the assumption that deeper seeds are older may also be violated, especially in cultivated soils, and cultivation by different implements may lead to quite complicated depth profiles, with mixtures of seed ages at all depths (Grundy *et al.*, 1999). Moreover, the seed bank of some species may have a bimodal distribution with seeds found at all depths with high densities in topsoil and in the deepest samples (Espinar *et al.*, 2005). Although seed mass and persistence are correlated (Thompson & Grime, 1979; Thompson *et al.*, 1993), the majority of variability in seed persistence is accounted for other variables as seed shape, likelihood of burial and germination physiology (Thompson *et al.*, 1998). So, methods to assess soil seed banks should be more investigated to confront the assumption of seed bank longevity according to vertical distribution in the soil or seasonal sampling.

In the traditional grasslands studied, established vegetation and transient seed bank are very dissimilar specially, as in others studies (Kirkham & Kent, 1997; Akinola *et al.*, 1998), whereas the persistent seed bank of these grasslands is most similar to the established vegetation. The persistent seed bank represents an intermediate pool species between established vegetation and transient seed bank. On the contrary, the undergrazing or overgrazing disturbance led to higher similarity between all the types of seed bank and vegetation composition than in the reference habitat (Dutoit & Alard, 1995; Chabrierie *et al.*, 2002, Matus *et al.*, 2005). As expected, the stable community, represented here as the traditional managed grasslands, decrease the similarity between transient seed bank and established vegetation (Bekker *et al.*, 1997; Matus *et al.*, 2005). The dissimilarity in grasslands is attributed to differences between the seed bank, considering the transient type, and vegetation to the fact that the most abundant species in the seed banks are the aboveground species that produce the greatest number of smallest seeds. Therefore, ruderal species with small seeds and high longevity are overrepresented in the seed bank (Dutoit & Alard, 1995; Chabrierie *et al.*, 2002). Indeed, most characteristic species of stable community, as the traditional grasslands, do not produce long lived seeds with high dispersal ability (van Duren *et al.*, 1998; Matus *et al.*, 2003; Lee, 2004). So, the seed banks of grasslands are highly represented by pioneer species, with extensive management defines by poor and pioneer species whereas intensive management differs by species indicative of nutrient-rich conditions. This eutrophication, caused by fertilizer application, animal excrements or atmospheric deposition of N compounds, results in less N-limited and more P-limited conditions associated with a decline in characteristic species for acid nutrient poor grasslands (Kleijn *et al.*, 2008). Our findings point out that, for these acid habitats, intensive grasslands and the nutrient rich condition associated explained a poor seed bank. This result could have consequences for grasslands restoration as eutrophication and acidification have more severe

adverse effects on recruitment than on growth and survival of established plant species (Vergeer *et al.*, 2003).

Importance of soil seed banks for restoring acid grasslands

Fields located adjacent to *Agrostion curtisii* acid grasslands have been used in this study as potential targets for recreation of these reference habitat. The absence of characteristic species and the high dominance of early successional species, in particular *Juncus sp.*, indicate that transient seed bank has a low conservation value. So, restoration of target plant community relying only on seed germination from the transient seed bank is not feasible in these acid grasslands (Bossuyt & Honnay, 2008). On the contrary, the persistent seed bank is a species pool more similar to the vegetation of traditional grasslands since only the long lived species seeds could represent the characteristics species absent for decades. The recruitment of species is therefore more limited by the transient seed bank than the persistent seed bank, however, no characteristic species was found among indicators species of the persistent seed bank. Furthermore, the seed banks of grasslands usually had high proportions of pioneer species. Extensive management increased the relative abundance of mid-, poor- and pioneer species and reduced the proportion of species indicative of nutrient rich conditions (Reiné *et al.*, 2004). To succeed recreation of semi-natural grasslands, the facilitation of the arrival of characteristic species should be handled in the same way as the restoration of initial habitat conditions. As a consequence, the efforts of restoration have to focus on the persistent seed bank and on extensively managed grassland which can be more useful in terms of regeneration from seeds than intensively managed ones. Since the remaining species-rich acid grasslands are few in France, this highlights also the importance to preserve these remaining grasslands.

Regardless of seed banks properties, conservation management and restoration could be confronted to many difficulties. On agricultural land, seed limitation and high soil fertility are the most important constraints to restoration. On sites that receive low fertilisation, extensive management is sufficient to overcome restoration of grasslands whereas the natural reversion to species-rich grassland in sites with high fertilisation has been shown to take several decades, even on sites adjacent to natural seed sources (Howe & Chancellor, 1983; Bekker *et al.*, 1997). Overall rates of reversion are generally slow presumably because microsite limitation and competitive exclusion reduce the establishment and spreading of introduced species (Walker *et al.*, 2004a). Furthermore, colonization of ex-arable fields is positively related to recruitment ability and not to dispersal ability (Öster *et al.*, 2009). So, recruitment ability is a key factor for colonization of ex-arable fields but it is also possible that the form of N deposition, and particularly NH_4^+ , plays an important role in adverse effects on species of acid grasslands. Soil variables, other than NH_4^+ , affect mostly plant recruitment (de Graaf *et al.*, 1997; van den Berg, *et al.*, 2003) whereas NH_4^+ could affect species at the juvenile stages as well as the adult stages. The seeds are a conservation way as they are more tolerant to unfavourable conditions than the plants and this would result that

both biogeochemical soil properties and pools of regenerative species in seed banks should be brought together for grasslands restoration.

Conclusion

Grasslands with the highest biodiversity value are usually associated with extensive farming systems, but widespread agricultural intensification in recent decades in Western Europe and elsewhere have contributed to their decline. This occurs by changes in plant species composition and a general decrease in plant species richness. The relationship between the composition of the transient and persistent seed banks and the associated vegetation highlights that the persistent rather than the transient seed bank is a potential pool for species conservation even if none characteristic species was found as indicator species of the persistent seed bank. Early successional species, adapted to temporally recurring suitable habitat conditions after disturbance, dominate the seed bank. Furthermore, restoration measures, consisting in the restoration of ex-agricultural lands, have to focus on extensive managed sites that have more favourable conditions than intensive managed sites. However, restoring species-rich grasslands based on soil seed bank is unlikely and other options need to be considered, such as the dispersion of seeds or the deliberate reintroduction of desirable species by sowing. Soil properties, as nutrient availability and pH associated to semi-natural grasslands, need also to be considered in grassland restoration and compared to the habitat reference.

References

- Akinola MO, Thompson K, Buckland SM (1998) Soil seed bank of an upland calcareous grassland after 6 years of climate and management manipulations. *Journal of Applied Ecology*, **35**, 544-552.
- Bensettiti F, Bouillet V., Chavaudret-Laborie C., Deniaud J. (2005) « Cahiers d'habitats » Natura 2000. *Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 4 - Habitats agropastoraux*. La documentation française, Paris.
- Bakker JP, Poschlod P, Strijkstra RJ, Bekker RM, Thompson K (1996) Seed banks and seed dispersal: important topics for restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica*, **45**, 461-490.
- Barralis G, Chadoeuf R (1987) Potentiel semencier des terres arables. *Weed Research*, **27**, 417-424.
- Bekker RM, Verweij GL, Smith REN, Reine R, Bakker JP, Schneider S (1997) Soil seed banks in European grasslands: does land use affect regeneration perspectives? *Journal of Applied Ecology*, **34**, 1293-1310.
- Bobbink R (1991) Effects of Nutrient Enrichment in Dutch Chalk Grassland. *Journal of Applied Ecology*, **28**, 28-41.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, *et al.* (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, **20**, 30-59.

- Bossuyt B, Honnay O (2008) Can the seed bank be used for ecological restoration? An overview of seed bank characteristics in European communities. *Journal of Vegetation Science*, **19**, 875-884.
- Chabrierie O, Alard D, Touzard B (2002) Calcereous grass soil seeds diversity in vegetation and reservoirs in north-western France. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, **80**, 827-840.
- Davies CE, Moss D & Hill MO (2004) *EUNIS habitat classification revised 2004*. Winfrith Technology Centre, Dorian Ecological Information Ltd. and Monks Wood, UK.
- De Foucault B (1986) Données systématiques sur la végétation prairiale mésophile du pays Basque et des landes de Gascogne. *Documents Phytosociologiques*, **10**, 203-219.
- de Graaf MCC, Bobbink R, Verbeek PJM, Roelofs JGM (1997) Aluminium toxicity and tolerance in three heathland species. *Water, Air, & Soil Pollution*, **98**, 229-239.
- Dufrene M, Legendre P (1997) Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, **67**, 345-366.
- Duprè C, Stevens CJ, Ranke T, *et al.* (2010) Changes in species richness and composition in European acid grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344-357.
- Dutoit T, Alard D (1995) Permanent seed banks in chalk grassland under various management regimes - their role in the restoration of species-rich plant-communities. *Biodiversity and Conservation*, **4**, 939-950.
- Edwards GR, Crawley MJ (1999) Herbivores, seed banks and seedling recruitment in mesic grassland. *Journal of Ecology*, **87**, 423-435.
- Espinar JL, Thompson K, Garcia LV (2005) Timing of seed dispersal generates a bimodal seed bank depth distribution. *American Journal of Botany*, **92**, 1759-1763.
- Fournier P (2000) *Les quatre flores de France*. Dunod, Paris, France.
- Gaudnik C, Corcket E, Clément B, *et al.* (2011) Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change. *Global Change Biology*, 1-15, doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02463.
- Grundy AC, Mead A, Burston S (1999) Modelling the effect of cultivation on seed movement with application to the prediction of weed seedling emergence. *Journal of Applied Ecology*, **36**, 663-678.
- Haines-Young R, Barr CJ, Firbank LG, *et al.* (2003) Changing landscapes, habitats and vegetation diversity across Great Britain. *Journal of Environmental Management*, **67**, 267-281.
- Hautier Y, Niklaus PA, Hector A (2009) Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, **324**, 636-638.
- Hill MO, Ellenberg H, (1999) *Ellenberg's Indicator Values for British Plants: Technical Annex, Ecological Factors Controlling Biodiversity in the British Countryside (ECOFAC) Research Report*, Institute of Terrestrial Ecology, DETR Publications Sale Centre, Rotherham.

- Hopfensperger KN (2007) A review of similarity between seed bank and standing vegetation across ecosystems. *Oikos*, **116**, 1438-1448.
- Howe CD, Chancellor RJ (1983) Factors affecting the viable seed content of soil beneath lowland pastures. *Journal of Applied Ecology*, **20**, 915-922.
- Kalamees R, Zobel M (2002) The role of the seed bank in gap regeneration in a calcareous grassland community. *Ecology*, **83**, 1017-1025.
- Kenkel NC, Orlóci L (1986) Applying Metric and Nonmetric Multidimensional Scaling to Ecological Studies: Some New Results. *Ecology*, **67**, 919-928.
- Kirkham FW, Kent M (1997) Soil seed bank composition in relation to the above-ground vegetation in fertilized and unfertilized hay meadows on a Somerset peat moor. *Journal of Applied Ecology*, **34**, 889-902.
- Kleijn D, Bekker RM, Bobbink R, De Graaf MCC, Roelofs JGM (2008) In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 680-687.
- Lee P (2004) The impact of burn intensity from wildfires on seed and vegetative banks, and emergent understory in aspen-dominated boreal forests. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique*, **82**, 1468-1480.
- Maskell LC, Smart SM, Bullock JM, Thompson K, Stevens CJ (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671-679.
- Matus G, Verhagen R, Bekker RM, Grootjans AP (2003) Restoration of the *Cirsio dissecti-Molinietum* in The Netherlands: Can we rely on soil seed banks? *Applied Vegetation Science*, **6**, 73-84.
- Matus G, Papp M, Tothmeresz B (2005) Impact of management on vegetation dynamics and seed bank formation of inland dune grassland in Hungary. *Flora*, **200**, 296-306.
- McCune B, Grace JB (2002) *Analysis of ecological communities*. MjM software Design, Glenden Beach, OR, US.
- Milberg P (1995) Soil seed bank after 18 years of succession from grassland to forest. *Oikos*, **72**, 3-13.
- Mitlacher K, Poschlod P, Rosen E, Bakker JP (2002) Restoration of wooded meadows - a comparative analysis along a chronosequence on Oland (Sweden). *Applied Vegetation Science*, **5**, 63-73.
- Muller FM, (1978) Seedlings of the north-western European lowland. Junk, The Hague, Boston.
- Öster M, Ask K, Römermann C, Tackenberg O, Eriksson O (2009) Plant colonization of ex-arable fields from adjacent species-rich grasslands: The importance of dispersal vs. recruitment ability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **130**, 93-99.
- Poschlod P, Kiefer S, Tränkle U, Fischer S, S B (1998) Plant Species Richness in Calcareous Grasslands as Affected by Dispersability in Space and Time. *Applied Vegetation Science*, **1**, 75-90.

- Reiné R, Chocarro C, Fillat F (2004) Soil seed bank and management regimes of semi-natural mountain meadow communities. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **104**, 567-575.
- Rich, T, Redbane, M, Fasham, M, McMeechan, F, Dobson, D (2005) Ground and shrub vegetation. In D. Hill, M. Fasham, G. Tucker, M. Shewry, and P. Shaw, (eds.), *Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring* pp. 201-222 Cambridge University press, Cambridge.
- Rivas-Goday S, Rivas-Martinez S (1963) Estudio y clasificacion de los pastizales espanoles. *Publication Ministerio de agricultura*, **277**, 269.
- Roberts HA, Neilson JE (1981) Changes in the Soil Seed Bank of Four Long-Term Crop/Herbicide Experiments. *Journal of Applied Ecology*, **18**, 661-668.
- Roem WJ, Klees H, Berendse F (2002) Effects of nutrient addition and acidification on plantspecies diversity and seed germination in heathland. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 937-948.
- Rosén E, van der Maarel E (2000) Restoration of alvar vegetation on Öland, Sweden. *Applied Vegetation Science*, **3**, 65-72.
- Schwickerath M (1944) Das hohe Venn und seine Randgebiete: Vegetation, Boden, und Landschaft. *Pflanzensoziologie*, **6**, 1-278.
- Smith RS, Shiel RS, Millward D, Corkhill P, Sanderson RA (2002) Soil seed banks and the effects of meadow management on vegetation change in a 10-year meadow field trial. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 279-293.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2010) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution*, **158**, 2940-2945.
- Stevens CJ, Duprè C, Gaudnik C, *et al.* (2011a) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207-215.
- Stevens CJ, Manning P, van den Berg LJJ, *et al.* (2011b) Ecosystem responses to reduced and oxidised nitrogen inputs in European terrestrial habitats. *Environmental Pollution*, **159**, 665-676.
- Thompson K, Grime JP (1979) Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology*, **67**, 893-921.
- Thompson K, Band SR, Hodgson JG (1993) Seed size and shape predict persistence in soil. *Functional Ecology*, **7**, 236-241.
- Thompson K, Bakker JP & Bekker RM (1997) *The soil seed banks of North West Europe: methodology, density and longevity*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Thompson K, Bakker JP, Bekker RM, Hodgson JG (1998) Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora. *Journal of Ecology*, **86**, 163-169.
- Valko O, Torok P, Tothmeresz B, Matus G (2011) Restoration Potential in Seed Banks of Acidic Fen and Dry-Mesophilous Meadows: Can Restoration Be Based on Local Seed Banks? *Restoration Ecology*, **19**, 9-15.

- van den Berg LJJ, Vergeer P, Roelofs JGM (2003) Heathland restoration in The Netherlands: Effects of turf cutting depth on germination of *Arnica montana*. *Applied Vegetation Science*, **6**, 117-124.
- van den Berg LJJ, Dorland E, Vergeer P, Hart MAC, Bobbink R, Roelofs JGM (2005) Decline of acid-sensitive plant species in heathland can be attributed to ammonium toxicity in combination with low pH. *New Phytologist*, **166**, 551-564.
- van Duren IC, Strykstra RJ, Grootjans AP, ter Heerdt GNJ, Pegtel DM (1998) A multidisciplinary evaluation of restoration measures in a degraded *Cirsio-Molinietum* fen meadow. *Applied Vegetation Science*, **1**, 115-130.
- Vandvik V, Heegaard E, Maren IE, Aarrestad PA (2005) Managing heterogeneity: the importance of grazing and environmental variation on post-fire succession in heathlands. *Journal of Applied Ecology*, **42**, 139-149.
- Vergeer P, Rengelink R, Ouborg NJ, Roelofs JGM (2003) Effects of population size and genetic variation on the response of *Succisa pratensis* to eutrophication and acidification. *Journal of Ecology*, **91**, 600-609.
- Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry*, **13**, 87-115.
- Wagner M, Poschod P, Setchfield RP (2003) Soil seed bank in managed and abandoned semi-natural meadows in Soomaa National Park, Estonia. *Annales Botanici Fennici*, **40**, 87-100.
- Walker KJ, Stevens PA, Stevens DP, Mountford JO, Manchester SJ, Pywell RF (2004a) The restoration and re-creation of species-rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. *Biological Conservation*, **119**, 1-18.
- Walker KJ, Pywell RF, Warman EA, Fowbert JA, Bhogal A, Chambers BJ (2004b) The importance of former land use in determining successful re-creation of lowland heath in southern England. *Biological Conservation*, **116**, 289-303.
- Wamelink GWW, van Dobben HF, Berendse F (2009) Vegetation succession as affected by decreasing nitrogen deposition, soil characteristics and site management: A modelling approach. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1762-1773.
- Webb NR (1998) The traditional management of European heathlands. *Journal of Applied Ecology*, **35**, 987-990.
- Wedin D, Tilman D (1993) Competition among grasses along a nitrogen gradient: initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs*, **63**, 199-229.

Appendix 1. Number of germinated seeds of each species recorded in the 10 sites (mean number of seeds was calculated for each type of management intensity from the mean of the three replicates per site). The percentage of the total number of seedlings and the percentage occurrence of all species in quadrat were also given. Characteristics species of traditional acid grasslands are represented in bold.

species	MI1			MI2			MI3		
	Number of seeds	% of total	Rel. Abun. in quadrats	Number of seeds	% of total	Rel. Abun. in quadrats	Number of seeds	% of total	Rel. Abun. in quadrats
<i>Achillea millefolium</i>	5	0.94	1.66	26	4.55	4.55	3	0.37	0.38
<i>Agrostis capillaris</i>	10	1.89	12.09	41	7.27	9.01	35	5.64	10.34
<i>Agrostis curtisii</i>	-	-	0.49	-	-	2.22	-	-	1.31
<i>Agrostis stolonifera</i>	5	0.94	0.62	4	0.59	0.19	6	0.86	-
<i>Aira praecox</i>	-	-	-	1	0.12	-	-	-	-
<i>Ajuga reptans</i>	-	-	-	1	0.12	-	-	-	-
<i>Amaranthus hybridus</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.04	-
<i>Anagalis arvensis</i>	-	-	-	3	0.53	-	12	1.89	0.81
<i>Anthemis nobilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	56	11.31	6.37	43	7.62	3.70	4	0.66	-
<i>Aphanes arvensis</i>	-	-	-	-	-	-	12	1.93	-
<i>Arrhenatherum bulbosum</i>	-	-	-	-	-	0.68	-	-	-
<i>Aster squamatus</i>	-	-	0.25	-	-	-	-	-	0.37
<i>Bellis perennis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1.73
<i>Betula pubescens</i>	-	-	0.49	-	-	-	-	-	-
<i>Bromus hordeaceus</i>	-	-	-	-	-	0.19	-	-	0.20
<i>Calluna vulgaris</i>	-	-	3.63	-	-	2.58	-	-	1.04
<i>Capsella bursa pastoris</i>	83	16.77	-	3	0.47	-	7	1.03	-
<i>Cardamine pratensis</i>	1	0.07	-	2	0.24	-	6	0.91	-
<i>Carex arenaria</i>	3	0.54	3.10	1	0.12	0.77	1	0.08	0.94
<i>Carex binervis</i>	1	0.13	0.62	3	0.53	0.85	1	0.08	1.32
<i>Carex flacca</i>	-	-	-	-	-	0.46	-	-	-
<i>Carex hirta</i>	-	-	-	-	-	0.97	-	-	-
<i>Carex pilulifera</i>	1	0.07	0.60	2	0.35	2.19	3	0.37	3.00
<i>Carum verticillatum</i>	-	-	-	-	-	1.25	-	-	-
<i>Centaurea jacea</i> var. <i>debauxii</i>	-	-	0.47	7	1.12	3.22	-	-	0.56
<i>Centaurium erythraea</i>	-	-	-	-	-	0.50	-	-	0.22
<i>Centaurium pulchellum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.37
<i>Cerastium fontanum</i>	6	1.21	-	5	0.89	0.25	39	6.34	1.04
<i>Chenopodium album</i>	53	10.71	-	3	0.53	-	4	0.53	-
<i>Chenopodium rubrum</i>	-	-	-	1	0.12	-	1	0.08	-
<i>Cirsium arvensis</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.04	-
<i>Coryza canadensis</i>	15	2.90	0.74	23	4.08	0.64	21	3.33	0.77
<i>Coronopus didymus</i>	-	-	-	2	0.30	-	4	0.58	-
<i>Crepis capillaris</i>	2	0.34	0.25	1	0.06	-	2	0.33	2.05
<i>Cynodon dactylon</i>	1	0.07	-	1	0.06	2.54	12	1.89	5.41
<i>Cyperus aggregatus</i>	1	0.07	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylis glomerata</i>	1	0.07	-	-	-	-	-	-	0.81
<i>Danthonia decumbens</i>	3	0.47	2.85	3	0.47	4.24	23	3.79	1.20
<i>Daucus carota</i>	-	-	-	3	0.47	1.13	5	0.78	1.03
<i>Digitaria sanguinalis</i>	1	0.07	-	3	0.47	-	1	0.04	-
<i>Echinochloa crus-gallis</i>	1	0.20	0.37	1	0.18	-	1	0.04	0.37
<i>Erica ciliaris</i>	-	-	-	-	-	1.24	-	-	-
<i>Erica cinerea</i>	9	1.75	5.53	12	2.01	2.11	1	0.04	0.32
<i>Erica scoparia</i>	-	-	1.31	-	-	0.21	-	-	-
<i>Erica tetralix</i>	-	-	-	-	-	0.21	-	-	0.51
<i>Euphrasia stricta</i>	-	-	-	-	-	1.24	-	-	-
<i>Festuca arundinacea</i>	-	-	-	-	-	0.71	-	-	-
<i>Festuca pratensis</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.08	3.60
<i>Festuca rubra</i>	8	1.48	2.31	27	4.78	5.63	11	1.73	4.63
<i>Frangula alnus</i>	-	-	0.25	-	-	0.25	-	-	-
<i>Galium verum</i>	-	-	-	-	-	0.41	-	-	-
<i>Geranium molle</i>	1	0.07	-	-	-	-	7	1.15	0.20
<i>Geranium rotundifolium</i>	-	-	-	1	0.18	-	3	0.41	-
<i>Gnaphalium uliginosum</i>	19	3.77	0.25	2	0.35	-	14	2.30	0.37
<i>Halimium alyssoides</i>	-	-	2.96	-	-	-	-	-	-
<i>Hedera helix</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19
<i>Helosciadium nodiflorum</i>	-	-	-	1	0.18	-	-	-	-

Appendix 1 (continued)

<i>Hieracium lactucella</i>	1	0.07	-	-	-	0.21	-	-	0.19
<i>Hieracium pilosella</i>	-	-	1.03	1	0.06	1.21	-	-	0.22
<i>Holcus lanatus</i>	2	0.34	2.45	4	0.59	2.84	3	0.49	4.91
<i>Hypericum humifusum</i>	3	0.47	0.25	8	1.36	1.04	8	1.23	0.46
<i>Hypericum perforatum</i>	-	-	-	-	-	0.44	-	-	0.22
<i>Hypericum pulcrum</i>	-	-	-	-	-	0.44	-	-	-
<i>Hypochoeris glabra</i>	-	-	-	2	0.35	0.21	-	-	0.55
<i>Hypochoeris radicata</i>	-	-	2.38	3	0.41	2.48	-	-	4.47
<i>Jasione montana</i>	-	-	0.72	-	-	-	-	-	-
<i>Juncus acutiflorus</i>	-	-	-	15	2.54	-	5	0.74	-
<i>Juncus bufonius</i>	32	6.40	0.25	85	14.94	-	129	21.23	0.22
<i>Juncus effusus</i>	5	0.88	-	5	0.83	-	5	0.78	-
<i>Leontodon hispidus</i>	-	-	0.49	-	-	1.06	-	-	3.69
<i>Leontodon saxitalis</i>	4	0.67	-	1	0.06	-	2	0.21	-
<i>Lepidium didymum</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.08	-
<i>Leucanthemum vulgare</i>	-	-	-	5	0.89	1.59	1	0.04	0.60
<i>Linum bienne</i>	-	-	-	1	0.06	0.45	-	-	-
<i>Lobelia urens</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.04	-
<i>Lolium perenne</i>	1	0.13	-	-	-	0.77	17	2.80	2.76
<i>Lonicera periclymenum</i>	-	-	0.30	-	-	-	-	-	-
<i>Lotus corniculatus</i>	2	0.34	0.49	2	0.24	2.05	1	0.16	1.12
<i>Luzula campestris</i>	3	0.54	2.42	2	0.35	1.55	2	0.29	3.47
<i>Medicago lupulina</i>	2	0.40	-	1	0.06	0.58	4	0.62	0.67
<i>Mentha arvensis</i>	-	-	-	1	0.06	-	-	-	-
<i>Molicea caerulea</i>	-	-	3.39	2	0.30	2.81	-	-	1.36
<i>Myosotis stricta</i>	1	0.13	-	16	2.78	-	1	0.16	-
<i>Oenothera biennis</i>	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-
<i>Ornithopus perpusillus</i>	8	1.55	0.48	9	1.54	0.59	4	0.53	0.61
<i>Oxalis acetosella</i>	-	-	-	1	0.06	0.19	2	0.21	-
<i>Paspalum dilatatum</i>	1	0.07	0.99	-	-	-	1	0.16	2.19
<i>Pedicularis sylvatica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22
<i>Petrorhagia prolifera</i>	-	-	-	-	-	0.39	-	-	-
<i>Physalis alkekengi</i>	1	0.07	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytolacca americana</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.04	-
<i>Pinus pinaster</i>	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-
<i>Plantago coronopus</i>	1	0.07	-	1	0.06	0.19	1	0.08	0.93
<i>Plantago lanceolata</i>	6	1.21	2.70	51	9.04	2.66	4	0.66	4.14
<i>Plantago major</i>	1	0.07	-	-	-	0.19	-	-	-
<i>Poa annua</i>	2	0.34	-	1	0.12	0.00	19	3.05	0.78
<i>Poa pratensis</i>	47	9.43	-	12	2.07	0.19	14	2.26	1.57
<i>Poa trivialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.41
<i>Polygala serpyllifolia</i>	6	1.08	-	1	0.12	0.66	-	-	-
<i>Polygala vulgaris</i>	-	-	-	-	-	1.19	-	-	-
<i>Portulaca oleracea</i>	3	0.54	-	-	-	-	7	1.07	-
<i>Potentilla erecta</i>	-	-	-	-	-	2.04	-	-	0.38
<i>Potentilla repens</i>	-	-	-	-	-	0.39	-	-	0.22
<i>Prunella vulgaris</i>	-	-	0.25	-	-	1.13	1	0.04	0.18
<i>Pseudarrhenatherum longifolium</i>	6	1.14	6.30	60	10.63	4.26	6	0.95	-
<i>Pteridium aquilinum</i>	-	-	-	-	-	0.77	-	-	-
<i>Quercus pyrenaica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38
<i>Quercus robur</i>	-	-	1.20	-	-	-	-	-	-
<i>Radiola linoides</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.04	-
<i>Ranunculus repens</i>	-	-	-	1	0.18	-	12	1.98	-
<i>Robinia pseudacacia</i>	-	-	0.99	-	-	-	-	-	-
<i>Rorippa sylvestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20
<i>Rubus fruticosus</i>	-	-	3.82	-	-	0.25	2	0.21	1.75
<i>Rumex acetosella</i>	78	15.69	3.84	56	9.86	1.52	42	6.91	1.64
<i>Rumex crispus</i>	-	-	-	-	-	0.39	3	0.41	0.20
<i>Rumex pulcher</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20
<i>Salix caprea</i>	-	-	0.99	-	-	-	-	-	-
<i>Sanguisorba minor</i>	-	-	-	-	-	0.58	-	-	-
<i>Saponaria officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.44
<i>Scabiosa columbaria</i>	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-
<i>Senecio vulgaris</i>	-	-	-	1	0.06	-	-	-	-
<i>Serratula tinctoria</i>	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-
<i>Simethis mattiazzii</i>	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	1	0.20	-	-	-	-	3	0.37	0.20
<i>Sonchus arvensis</i>	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-
<i>Spergula arvensis</i>	2	0.27	-	1	0.06	-	12	1.98	-

Appendix 1 (continued)

<i>Sporobolus indicus</i>	-	-	-	-	-	0.41	1	0.08	1.11
<i>Stellaria graminea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19
<i>Stellaria media</i>	1	0.07	-	6	0.95	-	17	2.76	-
<i>Taraxacum campylodes</i>	1	0.13	-	2	0.30	-	8	1.32	-
<i>Teucrium scorodonia</i>	-	-	1.65	-	-	-	-	-	-
<i>Thymus pulegioides</i>	-	-	0.95	-	-	0.39	-	-	-
<i>Trifolium campestre</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19
<i>Trifolium dubium</i>	-	-	0.49	-	-	0.19	-	-	0.31
<i>Trifolium fragiferum</i>	-	-	0.49	-	-	-	-	-	1.62
<i>Trifolium pratense</i>	1	0.20	-	1	0.06	0.40	4	0.58	0.38
<i>Trifolium repens</i>	3	0.54	-	1	0.12	0.93	19	3.00	7.28
<i>Tuberaria guttata</i>	2	0.34	1.45	-	-	-	2	0.25	-
<i>Ulex europaeus</i>	-	-	6.95	1	0.06	1.21	-	-	-
<i>Ulex minor</i>	-	-	4.37	-	-	2.52	-	-	-
<i>Verbascum nigrum</i>	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-
<i>Verbena officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	1	0.08	0.51
<i>Veronica arvensis</i>	2	0.27	-	1	0.06	-	5	0.74	0.28
<i>Veronica officinalis</i>	-	-	0.25	-	-	0.25	-	-	0.42
<i>Veronica persica</i>	3	0.54	-	-	-	-	13	2.10	-
<i>Viola canina</i>	-	-	-	-	-	1.14	-	-	0.19
<i>Vulpia bromoides</i>	-	-	-	1	0.06	-	-	-	0.69

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

La problématique générale de cette thèse s'est portée sur la compréhension de l'impact des dépôts d'azote atmosphérique sur la végétation, et plus particulièrement sur les communautés de prairies acides. En effet, il a été montré sans nul doute que, durant le siècle dernier, les activités anthropiques étaient responsables de la conversion du diazote en plusieurs formes d'azote réactif, menant à un doublement de la fixation de l'azote à l'échelle globale. Ces formes d'azote réactif, extrêmement mobiles dans l'environnement, conduisent alors à une cascade d'effets de l'atmosphère à l'hydrosphère, en passant par la végétation et le sol des écosystèmes terrestres. Ainsi, la menace des dépôts d'azote atmosphérique sur les écosystèmes est bien réelle et notamment sur des milieux oligotrophes et avec une faible capacité à neutraliser l'acidité du sol, comme les prairies acides !

EMPREINTE DES DEPOTS D'AZOTE A L'ECHELLE LOCALE ET EUROPEENNE

A une large échelle internationale, de la France à la Norvège, les prairies acides échantillonnées ont montré une diminution de biodiversité corrélée à l'augmentation de dépôts chroniques d'azote dans ces prairies (Stevens *et al.*, 2010). La richesse spécifique de ces prairies suit ainsi une relation curvilinéaire vis-à-vis de la gamme de dépôts d'azote (2-44 kg N ha⁻¹ an⁻¹) avec une diminution plus importante aux plus forts dépôts d'azote. La relation établie indique que les prairies les plus riches en espèces sont soumises à des dépôts ambiants d'azote entre 5 et 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹, mais cette richesse spécifique diminue fortement au-delà de 15-20 kg N ha⁻¹ an⁻¹. En revanche, à l'échelle du domaine atlantique français, aucune relation n'a pu être établie entre la biodiversité des prairies et les dépôts d'azote atmosphérique. Ce résultat s'explique probablement par le faible gradient de dépôts d'azote sur le domaine atlantique français (9-18 kg N ha⁻¹ an⁻¹). De plus, si la relation considérée entre la végétation et les dépôts d'azote est bien décrite par une fonction non linéaire, alors les écosystèmes seraient capables de tolérer continuellement de faibles niveaux d'azote. Ainsi, il existerait un seuil de tolérance, au dessous duquel aucun effet ou relation ne peut être remarqué entre un écosystème et les dépôts d'azote : la charge critique. Les résultats des études comparatives à l'échelle française et européenne soutiennent une gamme de charges critiques pour les prairies acides autour de 10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹, avec donc une réduction de la richesse spécifiques au-delà de cette valeur (Stevens *et al.*, 2010) et une stabilité de richesse spécifique en deçà.

Cependant, la structure des communautés végétales n'est pas seulement définie par la richesse spécifique mais également par la composition de ces espèces végétales. A l'échelle européenne, les changements de composition floristique sont moins apparents que la diminution de richesse spécifique dans les prairies acides, probablement par la présence d'espèces sensibles typiques d'une région. En revanche, à l'échelle française, des changements de composition végétale ont été mis plus clairement en lien avec les dépôts d'azote atmosphérique, principalement à l'échelle de types de communautés régionaux. Ainsi, au niveau du domaine atlantique français et européen, le changement de composition des

communautés s'est réalisé au profit d'espèces de Poacées dominantes, telles que *Festuca ovina sensu lato* et *Nardus stricta*, présentes dans les prairies acides les plus soumises aux dépôts d'azote. En parallèle, les espèces négativement associées aux dépôts d'azote incluent, au niveau français, des dicotylédones telles qu'*Arnica montana*, *Dactylorhiza maculata* et *Gentiana lutea* mais, au niveau européen, des espèces sans patron clair au niveau français telles qu'*Agrostis curtisii* et *Leontodon autumnalis*, *Campanula rotundifolia*. L'étude de l'impact des dépôts d'azote pourrait donc reposer sur l'étude d'espèces cibles bio-indicatrices d'un changement de conditions du milieu. En effet, les espèces de Poacées dominantes sur tout le domaine atlantique français et européen apparaissent comme des bio-indicateurs fiables d'un enrichissement en azote dans le milieu. En revanche, les espèces de dicotylédones négativement associées aux dépôts d'azote sont localisées dans une région et ne pourraient pas servir de bio-indicateur à large échelle. Ainsi, à l'échelle française et européenne, les changements de composition floristique se produisent globalement au détriment des espèces de petites tailles, telles des dicotylédones typiques d'une région, alors que les espèces de Poacées généralistes se maintiennent et dominent le couvert végétal. Tout comme pour la biodiversité, ce changement de composition végétale est visible dès 10-15 kg N ha⁻¹ an⁻¹ (Gaudnik *et al.*, 2011 ; Stevens *et al.*, 2010, 2011).

En résumé, les patrons de composition des prairies acides seraient principalement expliqués par le climat à une large échelle française ou européenne alors que les dépôts d'azote représenteraient un facteur local de la composition des communautés (Figure 5.1). Bien que l'empreinte des dépôts d'azote sur les prairies acides apparaisse secondairement par rapport aux changements climatiques, cette empreinte est détectée à la fois sur la richesse spécifique à large échelle et sur la composition spécifique locale à européenne, probablement par des effets, directs d'eutrophication et indirects d'acidification (Figure 5.1).

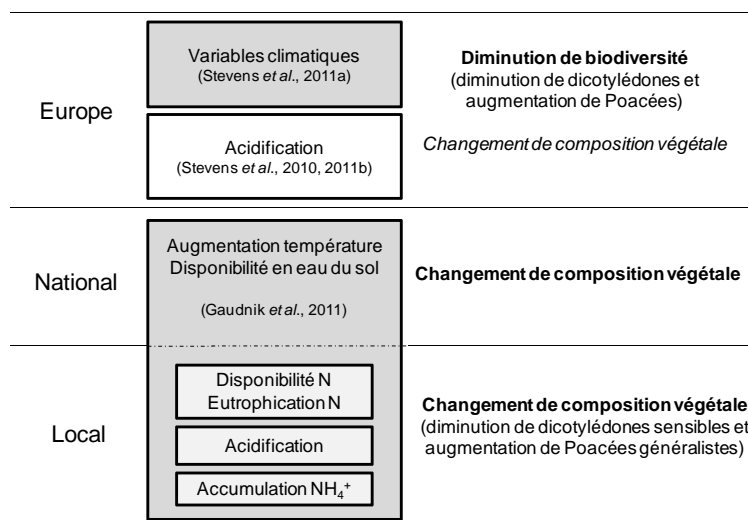


Figure 5.1. Principales empreintes des changements globaux, dépôts d'azote (en blanc) et changement climatique (en gris), sur la végétation des prairies acides détectées dans les études comparatives spatiales et temporelles.

PROCESSUS SUR LE MILIEU : INFLUENCE DES DEPOTS D'AZOTE

L'influence des dépôts d'azote a été étudiée à travers une approche expérimentale, qui complète l'approche comparative pour mettre en évidence les effets impliqués dans le milieu suite à cet enrichissement en azote. Cependant, les réponses peu marquées de la végétation et du sol suggèrent un effet limité de l'azote total dans notre système d'étude. Ainsi, les phénomènes de compétition dans les prairies acides, suite à l'enrichissement en azote, influenceraient beaucoup moins la végétation que les contraintes environnementales. En effet, dans le contexte actuel du changement global, l'influence respective des dépôts d'azote et du changement climatique reste un point à éclaircir. Nous avons notamment montré que le climat, à travers la température et la disponibilité en eau du sol, demeurerait le facteur dominant pour expliquer les patrons de végétations à large échelle. Toutefois, à l'échelle locale, la concomitance des facteurs climatiques et de dépôts d'azote pourrait rendre difficile l'interprétation seule de l'influence des dépôts d'azote. En effet, les faibles réponses de la végétation et du sol suite à un enrichissement en azote pourraient traduire un effet cumulatif, synergique ou antagoniste, des dépôts d'azote et du climat plutôt qu'un effet relativement neutre des dépôts d'azote sur l'écosystème. Pour distinguer l'effet du climat de celui des dépôts d'azote et comprendre l'interaction de ces facteurs, il serait intéressant de coupler les apports d'azote avec des contraintes hydriques contrôlées dans une approche expérimentale.

La forme d'azote représente un paramètre jusqu'ici largement sous-estimé dans l'étude des impacts des dépôts d'azote atmosphérique. La distinction de la forme réduite et oxydée de l'azote a permis de proposer différents mécanismes impliqués dans la réponse de la végétation selon les conditions du milieu. Dans les systèmes à faibles pH, l'apport important de NH_x relativement à NO_y provoque des changements dans la biogéochimie du sol et de la végétation appuyant l'hypothèse de toxicité de l'ammonium (Figure 5.2). Ce mécanisme soutient également l'hypothèse d'acidification de ces milieux dont le processus ne serait visible à long terme que par un effet d'accumulation de l'azote dans le sol. En revanche, dans les systèmes avec un pH plus élevés, autour de 6, la plupart de l'ammonium est nitrifié et la forme d'azote apporté dans le milieu deviendrait moins importante pour prédire la réponse de la communauté végétale. Ainsi dans ces milieux tels que les prairies calcaires, d'autres mécanismes influenceraient la communauté végétale notamment la compétition pour la lumière suite à l'enrichissement en azote du milieu. Toutefois, il existe une gamme de pH des milieux (zone grisée) où la réponse de la végétation aux dépôts d'azote est fortement incertaine puisque les forts taux de nitrification et la forte capacité tampon du sol rendent la forme d'azote secondaire (Figure 5.2).

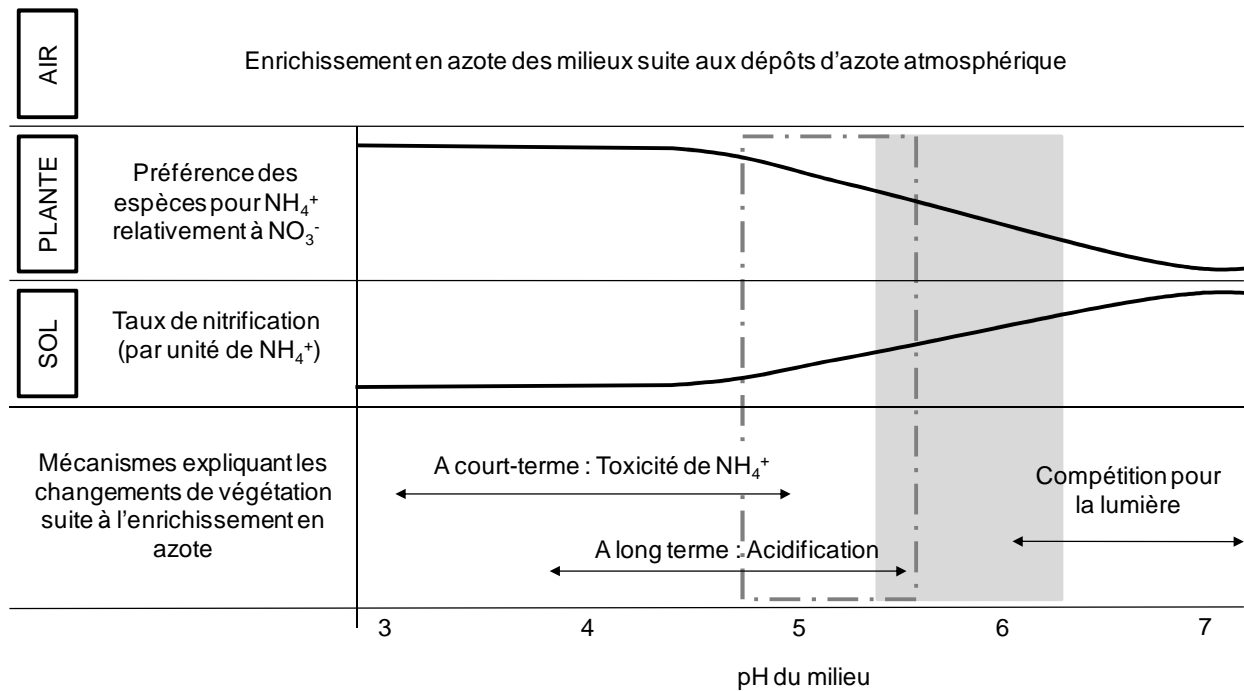


Figure 5.2. Mécanismes supposés des apports d'azote sur la composition des espèces végétales selon le pH du milieu (d'après Stevens *et al.*, 2011c). La zone en pointillés correspond au pH des prairies acides étudiées. La zone grisée représente la zone d'incertitude où les mécanismes ne sont plus régis ni par la forme d'azote avec un fort taux de nitrification, ni par l'acidification avec une capacité du sol à neutraliser l'acidité.

CONSERVATION ET RESTAURATION

La conservation des milieux face aux dépôts d'azote se base notamment sur le concept de charge critique nécessaire au maintien des milieux à protéger. Notre étude a permis d'appuyer la gamme de charges critiques à des valeurs autour de $10\text{-}15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Toutefois, il est nécessaire de valider cette valeur de charge critique par d'autres études expérimentales, notamment des expérimentations avec de faibles doses d'azote appliqué dans des sites recevant peu de dépôts d'azote ambiants. Il apparaît donc essentiel de concentrer les efforts de conservation sur les prairies soumises à de faibles dépôts d'azote afin de conserver les espèces les plus sensibles. Au-delà de la gamme de charge critique, nous avons supposé des effets d'acidification à long terme ou de toxicité à l'ammonium à court-terme. Toutefois, ce phénomène de toxicité à l'ammonium n'a pu être détecté que pour une unique dose d'ammonium. Il serait donc nécessaire d'envisager une expérimentation où les formes d'azote seraient appliquées à différentes doses pour détecter les valeurs seuils de cette toxicité. Ainsi, la charge critique pourrait être établie à la fois pour la forme réduite (NH_x) et oxydée (NO_y) puisque la charge critique de l'azote total ne rendrait pas forcément compte de la vulnérabilité du système à l'une ou l'autre forme d'azote.

Ce concept de charge critique se base également sur la vulnérabilité du système qui est supposée être identique pour chaque type d'écosystème. Toutefois, les variables climatiques, telles que la température et la sécheresse, et les variables édaphiques, telles que la texture et la

chimie du sol) pourraient jouer un rôle important dans la réponse des milieux à l'azote. Notamment, l'absence d'effet marqué de l'azote dans notre système pourrait s'expliquer par une immobilisation de l'azote dans le sol par les micro-organismes ou bien une lixiviation des nitrates en profondeur, qui diminuerait la disponibilité de l'azote dans le sol pour les plantes. Il est donc nécessaire de pouvoir localiser l'azote à travers les différents compartiments et acteurs de l'écosystème pour se représenter une image fidèle des processus impliqués. Ainsi, une étude avec un marquage de l'azote avec des isotopes (^{15}N) permettrait de suivre les différentes formes d'azote au sein des plantes et des micro-organismes.

Une fois cette charge critique établie le plus sûrement possible, il est nécessaire de cibler les écosystèmes d'intérêt patrimonial dont les dépôts ambiants sont inférieurs à cette charge critique. Ces systèmes où la composition et la biodiversité n'a pas été affectée par les dépôts d'azote nécessitent d'être conservés à travers des réseaux de préservation des milieux. La conservation des prairies existantes est d'autant plus nécessaire que la banque de graines de ces prairies a montré une dissimilarité avec la végétation établie. En cas de modification du milieu, il ne serait donc pas possible de se baser sur la banque de graines en place sur le site pour restaurer le milieu. De même, la banque de graines de sites candidats, gérés de manière extensive ou intensive, ne représente pas un potentiel d'espèces caractéristiques des prairies acides gérées traditionnellement avec une fauche annuelle. La conservation et la restauration des prairies acides ne pourraient donc pas se baser uniquement sur la banque et devraient être envisagées avec des moyens complémentaires pour rétablir les conditions biogéochimiques du sol, tels que le chaulage ou l'apport de carbone organique. Après avoir déterminé des espèces bio-indicatrices vis-à-vis des dépôts d'azote, il serait intéressant de réaliser des tests de germination sur ces plantes en les soumettant à différentes doses et différentes formes d'azote. Ces résultats pourraient alors être confrontés à des tests similaires sur des plantes adultes pour distinguer l'effet de l'azote à la fois de l'état de graines aux stades juvéniles et adultes des plantes.

QUESTIONS DE RECHERCHE ET HYPOTHESES

- *Au sein d'un même type de prairie acide, quelles sont les variations floristiques temporelles et spatiales et quels sont les facteurs globaux, entre les dépôts d'azote et le changement climatique, qui peuvent les expliquer?*

Les changements temporels de composition floristique des prairies acides sont visibles principalement dans les régions les plus montagneuses, caractérisées par de faibles températures et des valeurs de dépôts d'azote les plus élevées. Les facteurs globaux, changement climatique et dépôts d'azote, ont des effets sur la végétation dépendant de l'échelle géographique. L'effet cumulatif de charges modérées d'azote atmosphérique, dès $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, est perceptible sur la composition de la végétation de ces prairies à l'échelle locale, tout comme le climat, tandis que les variables climatiques demeurent le facteur prédominant à l'échelle plus large du domaine atlantique français.

- *Quels sont les processus impliqués dans les dépôts d'azote atmosphérique qui expliqueraient les patrons observés dans les communautés végétales?*

Lors d'expérimentation à court-terme (quatre ans), aucun effet de la quantité d'azote ne peut être détecté sur la biodiversité de la végétation des prairies acides. En effet, les groupes fonctionnels supposés répondre positivement (les Poacées) ou négativement (les Dicotylédones) ne montrent aucun patron clair de végétation en lien avec la quantité d'azote appliqué. Ainsi, le mécanisme de compétition pour la lumière n'est pas suggéré suite à l'enrichissement en azote dans les prairies acides. En revanche, la végétation et le sol montrent une forte réponse suite à l'application d'azote réduit, ciblée sur la diminution de biodiversité et l'augmentation de la nitrification. La toxicité de l'ammonium dans ces milieux acides représente donc le processus majeur par lequel la végétation de ces prairies est menacée.

- *Comment restaurer les habitats d'intérêt, tels que les prairies acides, potentiellement dégradés par les dépôts d'azote atmosphérique?*

L'utilisation de fauches répétées, avec exportation de biomasse, s'avère inefficace pour compenser l'enrichissement en azote puisque la végétation des prairies acides est peu influencée par la compétition aérienne pour la lumière. De plus, la conservation de ces prairies ne peut pas s'appuyer uniquement sur les banques de graines du sol, puisque celles-ci montrent une forte dissimilarité de composition floristique avec la végétation des prairies acides gérées traditionnellement. De même, l'absence d'espèces caractéristiques dans les banques de graines persistante et transitoire, de prairies gérées de manière extensive ou intensive, suggère que la restauration de ces prairies acides ne peut pas se baser uniquement sur le potentiel des banques de graines de sites candidats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aerts R, Chapin FS, III (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A reevaluation of processes and patterns. *Advances in ecological research*, **30**, 1-67.
- Anderson N, Strader R, Davidson C (2003) Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environment International*, **29**, 277-286.
- Arroniz-Crespo M, Leake JR, Horton P, Phoenix GK (2008) Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilisation in acidic grassland. *New Phytologist*, **180**, 864-874.
- Asman WAH, Sutton MA, Schjerring JK (1998) Ammonia: emission, atmospheric transport and deposition. *New Phytologist*, **139**, 27-48.
- Augusto L, Ranger J, (2001) Impact of tree species on soil solutions in acidic conditions. *Annals of Forest Science*, **58**, 47-58.
- Barton L, McLay CDA, Schipper LA, Smith CT (1999) Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Australian Journal of Soil Research*, **37**, 1073-1093.
- Bates JW (2002) Effects on bryophytes and lichens. In: *Air Pollution and Plant Life* (2nd edition), ed. JNB Bell and M Treshow, John Wiley and Sons, Chichester , pp. 309–342.
- Beauchamp EG (1997) Nitrous oxide emission from agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, **77**, 113-123.
- Bensettiti F, Boulet V., Chavaudret-Laborie C., Deniaud J. (2005) « Cahiers d'habitats » Natura 2000. *Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire. Tome 4 - Habitats agropastoraux*. La documentation française, Paris.
- Berge E, Bartnicki J, Olendrzynski K, Tsyro SG (1999) Long-term trends in emissions and transboundary transport of acidifying air pollution in Europe. *Journal of Environmental Management*, **57**, 31-50.
- Berlin G (1998) *Semi-natural meadows in southern Sweden - changes over time and the relationship between nitrogen supply and management*. PhD thesis, Lund University.
- Berlin GAI, Linusson A-C, Olsson EGA (2000) Vegetation changes in semi-natural meadows with unchanged management in southern Sweden, 1965-1990. *Acta Oecologica*, **21**, 125-138.
- Blaser P, Zysset M, Zimmermann S, Luster J (1999) Soil acidification in southern Switzerland between 1987 and 1997: A case study based on the critical load concept. *Environmental Science & Technology*, **33**, 2383-2389.
- Bloom AJ, Chapin FS, III, Mooney HA (1985) Resource limitation in plants- an economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 363-392.
- Bobbink R (1991) Effects of Nutrient Enrichment in Dutch Chalk Grassland. *Journal of Applied Ecology*, **28**, 28-41.
- Bobbink R (1998) Impacts of tropospheric ozone and airborne nitrogenous pollutants on natural and seminatural ecosystems: a commentary. *New Phytologist*, **139**, 161-168.
- Bobbink R, Lamers LPM. (2002) Effects of increased nitrogen deposition. In: *Air Pollution and Plant Life* (2nd edition), ed. JNB Bell and M Treshow, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 201–235.

- Bobbink R, Ashmore M, Braun S, Flückiger W, van den Wyngaert IJJ (2003) Empirical critical loads for natural and semi-natural ecosystems: 2002 update. In: *Empirical Critical Loads of Nitrogen*, ed. B Achermann and R Bobbink, Swiss Agency for Environment Forests and Landscape, Bern, pp. 43–169.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, *et al.* (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, **20**, 30-59.
- Bobbink R, Hettelingh JP (2011) Review and revision of empirical critical loads and dose-response relationships. RIVM Report 680359002, Coordination Centre for Effects, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Noordwijkerhout.
- Bolan NS, Hedley MJ, White RE (1991) Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant and Soil*, **134**, 53-63.
- Bolan NS, Adriano DC, Curtin D (2003) Soil acidification and liming interactions with nutrient and heavy metal transformation and bioavailability. *Advances in Agronomy, Vol 78*, **78**, 215-272.
- Bouwman AF, Lee DS, Asman WAH, Dentener FJ, VanderHoek KW, Olivier JGJ (1997) A global high-resolution emission inventory for ammonia. *Global Biogeochemical Cycles*, **11**, 561-587.
- Bouwman AF (1998) Environmental science - Nitrogen oxides and tropical agriculture. *Nature*, **392**, 866-867.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 567-584.
- Britton AJ, Pakeman RJ, Carey PD, Marrs RH (2001) Impacts of climate, management and nitrogen deposition on the dynamics of lowland heathland. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 797-806.
- Brunsting AMH, Heil GW (1985) The role of nutrients in the interactions between a herbivorous beetle and some competing plant species in heathlands. *Oikos*, **44**, 23-26.
- Burger M, Jackson LE (2003) Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**, 29-36.
- Campbell JL, Rustad LE, Boyer EW, *et al.* (2009) Consequences of climate change for biogeochemical cycling in forests of northeastern North America. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, **39**, 264-284.
- Cape JN, van der Eerden LJ, Sheppard LJ, Leith ID, Sutton MA (2009) Evidence for changing the critical level for ammonia. *Environmental Pollution*, **157**, 1033-1037.
- Carroll JA, Johnson D, Morecroft M, Taylor A, Caporn SJM, Lee JA (2000) The effect of long-term nitrogen additions on the bryophyte cover of upland acidic grasslands. *Journal of Bryology*, **22**, 83-89.
- Carroll JA, Caporn SJM, Johnson D, Morecroft MD, Lee JA (2003) The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **121**, 363-376.

- Ceulemans T, Merck R, Hens M, Honnay O (2011) A trait-based analysis of the role of phosphorus vs. nitrogen enrichment in plant species loss across North-west European grasslands. *Journal of Applied Ecology*, doi: 10.1111/j.1365-2664.2011.02023.
- Chapin FS (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 133-260.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, *et al.* (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, **405**, 234-242.
- Chase JM, Leibold MA (2002) Spatial scale dictates the productivity-biodiversity relationship. *Nature*, **416**, 427-430.
- Clark CM, Tilman D (2008) Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, **451**, 712-715.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, *et al.* (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**, 623-645.
- Cornell SE, Jickells TD, Cape JN, Rowland AP, Duce RA (2003) Organic nitrogen deposition on land and coastal environments: a review of methods and data. *Atmospheric Environment*, **37**, 2173-2191.
- Costa E, Perez J, Kreft JU (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, **14**, 213-219.
- de Graaf MCC, Bobbink R, Roelofs JGM, Verbeek PJM (1998) Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecology*, **135**, 185-196.
- Derwent R, Hertel O (1998) Transformation of air pollutants. In: *Urban Air Pollution: European Aspects*, ed. J Fenger, O Hertel, F Palmster, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- de Vries W (2009) Assessment of the relative importance of nitrogen deposition and climate change on the sequestration of carbon by forests in Europe: an overview. *Forest Ecology and Management*, **258**, vii-x.
- de Wit HA, Mulder J, Nygaard PH, Aamlid D, Huse M, Kortnes E, Wollebaek G & Brean R (2001) Aluminium: the need for a re-evaluation of its toxicity and solubility in mature forest stands. *Water Air and Soil Pollution*, **1**, 109-118.
- Dise NB, Rothwell JJ, Gauci V, van der Salm C, de Vries W (2009) Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *Science of the Total Environment*, **407**, 1798-1808.
- Dise NB, Ashmore M, Belyazid S *et al.* (2011) Nitrogen as a threat to European terrestrial biodiversity. In: *The European Nitrogen Assessment*, ed. MA Sutton, CM Howard, JW Erisman *et al.* Cambridge University Press.
- Duprè C, Stevens CJ, Ranke T, *et al.* (2010) Changes in species richness and composition in European acid grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, **16**, 344-357.
- European Environmental Agency (2005). "The European Environment: State and Outlook 2005. Part A. Integrated Assessment."

- Ellenberg, H (1988) *Vegetation ecology of Central Europe*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Elzing A, Monteny GJ (1997) Ammonia emission in a scale model of a dairy-cow house. *Transactions of the Asae*, **40**, 713-720.
- Eviner VT, Chapin FS (2003) Functional matrix: A conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **34**, 455-485.
- Erisman JW, Domburg N, de Vries W, Kros H, de Haan B, Sanders K (2005) The Dutch N-cascade in the European perspective. *Science in China Series C-Life Sciences*, **48**, 827-842.
- Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, **1**, 636-639.
- Emmett BA, (2007) Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems: Some recent findings and their implications for our conceptual framework. *Water Air and Soil Pollution Focus*, **7**, 99-109.
- Fagerli H, Aas W (2008) Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution*, **154**, 448-461.
- Falkengren-Grerup U (1998) Nitrogen response of herbs and graminoids in experiments with simulated acid soil solution. *Environmental Pollution*, **102**, 93-99.
- Flückiger W, Braun S and Hiltbrunner E (2002) Effects of air pollutants on biotic stress. In: *Air Pollution and Plant Life* (2nd edition), ed. J. N. B. Bell, and M. Treshow, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 379-406.
- Fowler D, Flechard C, Skiba U, Coyle M, Cape JN (1998) The atmospheric budget of oxidized nitrogen and its role in ozone formation and deposition. *New Phytologist*, **139**, 11-23.
- Fowler D, Smith RI, Muller JBA, Hayman G, Vincent KJ (2005) Changes in the atmospheric deposition of acidifying compounds in the UK between 1986 and 2001. *Environmental Pollution*, **137**, 15-25.
- Galloway JN, Schlesinger WH, Levy H, Michaels A, Schnoor JL (1995) Nitrogen-fixation - Anthropogenic enhancement - Environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*, **9**, 235-252.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, *et al.* (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, **70**, 153-226.
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, *et al.* (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**, 889-892.
- Gaston KJ (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature*, **405**, 220-227.
- Gaudnik C, Corcket C, Clément B, *et al.* (2011) Detecting the footprint of changing atmospheric nitrogen deposition loads on acid grasslands in the context of climate change. *Global change Biology*, **17**, 3351-3365.
- Gerdol R, Petraglia A, Bragazza L, Iacumin P, Brancaleoni L (2007) Nitrogen deposition interacts with climate in affecting production and decomposition rates in Sphagnum mosses. *Global Change Biology*, **13**, 1810-1821.

- Gigon A, Rorison IH (1972) The response of some ecologically distinct plant species to nitrate- and to ammonium-nitrogen. *Journal of Ecology*, **60**, 93–102
- Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, *et al.* (2002) The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 855-864.
- Grime JP (1977) Evidence for existence of 3 primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist*, **111**, 1169-1194.
- Grime JP (1979) *Plant strategies and vegetation processes*. Chichester: John Willey & Sons Ltd.
- Hallingback T (1992) The effect of air-pollution on mosses in Southern Sweden *Biological Conservation*, **59**, 163-170.
- Hautier Y, Niklaus PA, Hector A (2009) Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, **324**, 636-638.
- Haines-Young R, Barr CJ, Firbank LG, *et al.* (2003) Changing landscapes, habitats and vegetation diversity across Great Britain. *Journal of Environmental Management*, **67**, 267-281.
- Havill DC, Lee JA, Stewart GR (1974) Nitrate Utilization by Species from Acidic and Calcareous Soils. *New Phytologist*, **73**, 1221-1231.
- Hertel O, Skjoth CA, Lofstrom P, Geels C, Frohn LM, Ellermann T, Madsen PV (2006) Modelling nitrogen deposition on a local scale - A review of the current state of the art. *Environmental Chemistry*, **3**, 317-337.
- Hertel O, Reis S, Skjøth CA, *et al.* (2011) Nitrogen processes in the atmosphere. In: *The European Nitrogen Assessment*, ed. MA Sutton, CM Howard, JW Erisman *et al.* Cambridge University Press.
- Hettelingh JP, Posch M, Slootweg J (2008) Status of the critical loads database and impact assessment. In: *Critical Load, Dynamic Modelling and Impact Assessment in Europe*. eds. JP Hettelingh, M Posch, J Slootweg, Coordination Centre for Effects, Netherlands Environmental Assessment Agency, pp. 15–28.
- Hikosaka K, Terashima I (1996) Nitrogen partitioning among photosynthetic components and its consequence in sun and shade plants. *Functional Ecology*, **10**, 335-343.
- Hikosaka K, Hirose T (2001) Nitrogen uptake and use by competing individuals in a *xanthium canadense* stand. *Oecologia*, **126**, 174-181.
- Hikosaka K (2004) Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: Patterns, physiological causes, and ecological importance. *J. Plant Res*, **117**, 481-494.
- Hill MO, Ellenberg H, (1999) Ellenberg's Indicator Values for British Plants: Technical Annex, Ecological Factors Controlling Biodiversity in the British Countryside (ECOFAC) Research Report, Institute of Terrestrial Ecology, DETR Publications Sale Centre, Rotherham.
- Horswill P, O'Sullivan O, Phoenix GK, Lee JA, Leake JR (2008) Base cation depletion, eutrophication and acidification of species-rich grasslands in response to long-term simulated nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **155**, 336-349.

- Hov O, Hjollo BA, Eliassen A (1994) Transport distance of ammonia and ammonium in Northern Europe. 1. Model description. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, **99**, 18735-18748.
- Hubbell J (2001) *The neutralist theory of ecology*. Princeton University Press
- Hughes L (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 56-61.
- IFEN. 2002. Chiffres-clés 2002 de l'environnement. IFEN, www.ifen.fr
- IPCC (2007) Climate change and its impacts in the near and long term under different scenarios. In: *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (ed Core Writing Team Pachauri, R.K and Reisinger, A.), pp. 104. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Jackson LE, Burger M, Cavagnaro TR (2008) Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 341-363.
- Jarvis SC, Stockdale EA, Shepherd MA, Powlson DS (1996) Nitrogen mineralization in temperate agricultural soils: Processes and measurement. *Advances in Agronomy*, **57**, 187-235.
- Johnson DW, Cole DW (1980) Anion mobility in soils: Relevance to nutrient transport from forest ecosystems. *Environment International*, **3**, 79-90.
- Johnson D, Leake JR, Lee JA (1999) The effects of quantity and duration of simulated pollutant nitrogen deposition on root-surface phosphatase activities in calcareous and acid grasslands: a bioassay approach. *New Phytologist*, **141**, 433-442.
- Karl DM (2002) Nutrient dynamics in the deep blue sea. *Trends in Microbiology*, **10**, 410-418.
- Kleijn D, Bekker RM, Bobbink R, De Graaf MCC, Roelofs JGM (2008) In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 680-687.
- Krupa SV (2003) Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, **124**, 179-221.
- Lavergne S, Thuiller W, Molina J, Debussche M (2005) Environmental and human factors influencing rare plant local occurrence, extinction and persistence: a 115-year study in the Mediterranean region. *Journal of Biogeography*, **32**, 799-811.
- Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**, 545-556.
- Lee JA (1998) Unintentional experiments with terrestrial ecosystems : ecological effects of sulfur and nitrogen pollutants. *Journal of Ecology*, **86**, 1-12.
- Lee JA, Caporn SJM (1998) Ecological effects of atmospheric reactive nitrogen deposition on semi-natural terrestrial ecosystems. *New Phytologist*, **139**, 127-134.

- Leip A, Achermann B, Billen G *et al.* (2011) Integrating nitrogen fluxes at the European scale. In: *The European Nitrogen Assessment*, ed. MA Sutton, CM Howard, JW Erisman *et al.* Cambridge University Press.
- Lucassen ECHET, Bobbink R, Smolders AJP, van der Ven PJM, Lamers LPM, Roelofs JGM (2002) Interactive effects of low pH and high ammonium levels responsible for the decline of *Cirsium dissectum* (L.) Hill. *Plant Ecology*, **165**, 45-52.
- Machefert SE, Dise NB, Goulding KWT, Whitehead PG (2002) Nitrous oxide emission from a range of land uses across Europe. *Hydrology and Earth System Sciences*, **6**, 325-337.
- Magnani F, Mencuccini M, Borghetti M, *et al.* (2007) The human footprint in the carbon cycle of temperate and boreal forests. *Nature*, **447**, 848-852.
- Maskell LC, Smart SM, Bullock JM, Thompson K, Stevens CJ (2010) Nitrogen deposition causes widespread loss of species richness in British habitats. *Global Change Biology*, **16**, 671-679.
- Meyer A, Grote R, Polle A, Butterbach-Bahl K (2010) Simulating mycorrhiza contribution to forest C- and N cycling-the MYCOFON model. *Plant and Soil*, **327**, 493-517.
- Monteith J, Unsworth M (2008) *Principles of Environmental Physics*, 3rd Eds, Elsevier, New York.
- Morecroft MD, Sellers EK, Lee JA (1994) An experimental investigation into the effects of atmospheric nitrogen deposition on two semi-natural grasslands. *Journal of Ecology*, **82**, 475-483.
- Mountford JO, Lakhani KH, Kirkham FW (1993) Experimental assessment of the effects of nitrogen addition under hay-cutting and aftermath grazing on the vegetation of meadows on a somerset peat moor *Journal of Applied Ecology*, **30**, 321-332.
- Näsholm T (1998) Qualitative and quantitative changes in plant nitrogen acquisition induced by anthropogenic nitrogen deposition. *New Phytologist*, **139**, 87-90.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U (2009) Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, **182**, 31-48.
- NEG-TAP (2001) In: *Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK*. CEH, Edinburgh.
- Nihlgård B (1985) The ammonium hypothesis - an additional explanation of the forest dieback in Europe. *Ambio*, **14**, 2-8.
- Nilsson, J, Grennfelt, P (Eds) (1988) Critical Loads for Sulphur and Nitrogen, Nord, UNECE/Nordic council workshop report, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, 418 pp.
- Oenema O, Witzke HP, Klimont Z, Lesschen JP, Velthof GL (2009) Integrated assessment of promising measures to decrease nitrogen losses from agriculture in EU-27. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **133**, 280-288.
- Olsson MO, Falkengren-Grerup U (2000) Potential nitrification as an indicator of preferential uptake of ammonium or nitrate by plants in an oak woodland understory. *Annals of Botany*, **85**, 299-305.

- Paulissen MPCP, van der Ven PJM, Dees AJ, Bobbink R (2004) Differential effects of nitrate and ammonium on three fen bryophyte species in relation to pollutant nitrogen input. *New Phytologist*, **164**, 451-458.
- Pearson J, Stewart GR (1993) Tansley Review No. 56 : The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, **125**, 283-305.
- Phoenix GK, Booth RE, Leake JR, Read DJ, Grime JP, Lee JA (2003) Effects of enhanced nitrogen deposition and phosphorus limitation on nitrogen budgets of semi-natural grasslands. *Global Change Biology*, **9**, 1309-1321.
- Poorter H, Evans JR (1998) Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, **116**, 26-37.
- Prather M, Ehalt D, Dentener F, Derwent R, Dlugokencky E, Holland E, Isaksen I, Katima J, Kirchhoff V, Matson P, Midgley P and Wang M. (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K and Johnson C.A. (eds), Climate change 2001: the scientific basis. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, NY.
- Pruppacher HR, Jaenicke R (1995) The processing of water-vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate. *Atmospheric Research*, **38**, 283-295.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2007) *Biologie végétale, 2^e édition* (trad. de la 7^e édition américaine Jules Bouharmont et révision scientifique Charles-Marie Evrard), De Boeck.
- Reinds GJ, Posch M, De Vries W, Slootweg J, Hettelingh JP (2008) Critical loads of sulphur and nitrogen for terrestrial ecosystems in Europe and Northern Asia using different soil chemical criteria. *Water Air and Soil Pollution*, **193**, 269-287.
- Rennenberg H, Dannenmann M, Gessler A, Kreuzwieser J, Simon J, Papen H (2009) Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology*, **11**, 4-23.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1141-1153.
- Rodenkirchen H (1992) Effects of acidic precipitation, fertilization and liming on the ground vegetation in coniferous forests of southern Germany. *Water Air and Soil Pollution*, **61**, 279-294.
- Roem WJ, Klees H, Berendse F (2002) Effects of nutrient addition and acidification on plantspecies diversity and seed germination in heathland. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 937-948.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, *et al.* (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770-1774.
- Serveau L, Allemand N, André JM *et al.* (2011) Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France - Séries sectorielles et analyses étendues. Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA).

- Schimel JP, Bennett J (2004) Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology*, **85**, 591-602.
- Sheppard LJ, Leith ID, Crossley A, Van Dijk N, Fowler D, Sutton MA, Woods C (2008) Stress responses of *Calluna vulgaris* to reduced and oxidised N applied under 'real world conditions'. *Environmental Pollution*, **154**, 404-413.
- Simpson D, Fagerli H, Jonson JE, Tsyro S, Wind P, Tuovinen J-P (2003). *Transboundary acidification, eutrophication and ground level ozone in Europe Unified EMEP Model Description, EMEP Status Report 1/ 2003 Part I, EMEP/MS-CHEM Report*. The Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway.
- Simpson D, Aas W, Bartnicki J *et al.* (2011) Atmospheric transport and deposition of nitrogen in Europe. In: *The European Nitrogen Assessment*, ed. MA Sutton, CM Howard, JW Erisman *et al.*, Cambridge University Press.
- Smil V (1999) Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*, **13**, 647-662.
- Spranger T, Hettelingh JP, Slootweg J, Posch M (2008) Modelling and mapping long-term risks due to reactive nitrogen effects: An overview of LRTAP convention activities. *Environmental Pollution*, **154**, 482-487.
- Stevens CJ, Dise NB, Mountford JO, Gowing DJ (2004) Impact of Nitrogen Deposition on the Species Richness of Grasslands. *Science*, **303**, 1876-1879.
- Stevens CJ, Dise NB, Gowing DJ, Mountford JO (2006) Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology*, **12**, 1823-1833.
- Stevens CJ, Thompson K, Grime JP, Long CJ, Gowing DJG (2010a) Contribution of acidification and eutrophication to declines in species richness of calcifuge grasslands along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Functional Ecology*, **24**, 478-484.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2010b) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution*, **158**, 2940-2945.
- Stevens CJ, Duprè C, Gaudnik C, *et al.* (2011a) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 207-215.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, *et al.* (2011b) The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution*, **159**, 2243-2250.
- Stevens CJ, Manning P, van den Berg LJJ, *et al.* (2011c) Ecosystem responses to reduced and oxidised nitrogen inputs in European terrestrial habitats. *Environmental Pollution*, **159**, 665-676.
- Stevens CJ, Gowing DJG, Wotherspoon KA, *et al.* (2011d) Addressing the impact of atmospheric nitrogen deposition on Western European grasslands. *Environmental management, (in press)*.
- Suding KN, Collins SL, Gough L, *et al.* (2005) Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4387-4392.

- Sutton MA, Dragosits U, Tang YS, Fowler D (2000) Ammonia emissions from non-agricultural sources in the UK. *Atmospheric Environment*, **34**, 855-869.
- Sutton MA, Erisman JW, Dentener F, Moller D (2008) Ammonia in the environment: From ancient times to the present. *Environmental Pollution*, **156**, 583-604.
- Sverdrup H, Warfvinge P (Eds.) (1993) *The effect of soil acidification on the growth of trees, grass, and herbs as expressed by the (Ca+Mg+K)/Al ratio*, Lund University.
- Thuiller W, Lavorel S, Araujo MB, Sykes MT, Prentice IC (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8245-8250.
- Throop HL, Lerdau MT (2004) Effects of nitrogen deposition on insect herbivory: Implications for community and ecosystem processes. *Ecosystems*, **7**, 109-133.
- Tilman D (1982) *Resource competition and community structure*. New Jersey, Princeton University Press.
- Turner MM, Henry HAL (2009) Interactive effects of warming and increased nitrogen deposition on ¹⁵N tracer retention in a temperate old field: seasonal trends. *Global Change Biology*, **15**, 2885-2893.
- Ulrich B (1983) Soil acidity and its relation to acid deposition. In: *Effects of Accumulation of Air Pollutants in Ecosystems*, ed. B Ulrich and J Pankrath, Reidel Publishing, Boston, MA, pp. 127-146.
- Ulrich E, Williot B (1993) Les dépôts atmosphériques en France de 1850 à 1990. Rapport de l'Office National des Forêts, Fontainebleau, France.
- van Breemen N, Burrough PA, Velthorst EJ, van Dobben HF, de Wit T, Ridder TB, Reijnders HFR (1982) Soil acidification from atmospheric ammonium sulphate in forest canopy throughfall. *Nature*, **299**, 548-550.
- van den Berg LJJ, Peters CJH, Ashmore MR, Roelofs JGM (2008) Reduced nitrogen has a greater effect than oxidised nitrogen on dry heathland vegetation. *Environmental Pollution*, **154**, 359-369.
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**, 296-310.
- van Dijk HFG, de Louw MHJ, Roelofs JGM, Verburgh JJ (1990) Impact of artificial, ammonium-enriched rainwater on soils and young coniferous trees in a greenhouse. Part II--Effects on the trees. *Environmental Pollution*, **63**, 41-59.
- van Egmond K, Bresser T, Bouwman L (2002) The European nitrogen case. *Ambio*, **31**, 72-78.
- van Herk CM, Mathijssen-Spiekman EAM, de Zwart D (2003) Long distance nitrogen air pollution effects on lichens in Europe. *The Lichenologist*, **35**, 347-359.
- Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry*, **13**, 87-115.
- Vitousek PM (1994) Beyond global warming - Ecology and global change. *Ecology*, **75**, 1861-1876.

- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, *et al.* (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications*, **7**, 737-750.
- Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, *et al.* (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, **57**, 1-45.
- Warren CR, Adams MA (2004) Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **9**, 270-274.
- Wedin D, Tilman D (1993) Competition among grasses along a nitrogen gradient: initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs*, **63**, 199-229.
- Westoby M (1998) A leaf-height-seed (lhs) plant ecology strategy scheme. *Plant and soil*, **199**, 213-227.
- Westoby M, Warton D, Reich PB (2000) The time value of leaf area. *The American Naturalist*, **155**, 649-656.
- Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**, 1723-1732.
- Emission Database for Global Atmospheric Research (EDGAR) disponible à <http://edgar.jrc.ec.europa.eu>. Ce site contient les émissions anthropiques, passées et présentes, des gaz à effets de serre et des polluants atmosphériques par pays selon une grille spatiale.
- European Mapping and Emissions Programme (EMEP) disponible à www.emep.int. Ce site contient les résultats des émissions et des dépôts d'azote modélisés, sur l'ensemble de la France, jusqu'en 2009.

ANNEXES

-ANNEXE 1-

Article 1 Nitrogen deposition threatens species richness of
grasslands across Europe

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise.

Environmental Pollution (2010) 158: 2940-2945

Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe

Carly J. Stevens^{a,b,1}, Cecilia Duprè^c, Edu Dorland^{d,e}, Cassandre Gaudnik^f, David J.G. Gowing^a, Albert Bleeker^g, Martin Diekmann^c, Didier Alard^f, Roland Bobbink^h, David Fowlerⁱ, Emmanuel Corcket^f, J. Owen Mountford^j, Vigdis Vandvik^k, Per Arild Aarrestad^l, Serge Muller^m, Nancy B. Diseⁿ.

^aDepartment of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

^bLancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK.

^cInstitute of Ecology, FB 2, University of Bremen, Leobener Str., DE-28359 Bremen, Germany.

^dSection of Landscape Ecology, Department of Geobiology, Utrecht University, PO Box 80084, 3508 TB Utrecht, The Netherlands.

^eCurrent address: Staatsbosbeheer, Postbus 1300, 3970 BH Driebergen, The Netherlands.

^fUniversity of Bordeaux 1. UMR INRA 1202 Biodiversity, Genes and Communities, Equipe Ecologie des Communautés, Bâtiment B8 - Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France.

^gDepartment of Air Quality & Climate Change, Energy Research Centre of the Netherlands, PO Box 1, 1755, ZG Petten, The Netherlands.

^hB-WARE Research Centre, Radboud University, PO Box 9010, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands.

ⁱNERC Centre for Ecology and Hydrology, Bush Estate, Penicuik, Midlothian, EH26 0QB, UK.

^jNERC Centre for Ecology & Hydrology, MacLean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, Oxfordshire, OX10 8BB, UK.

^kDepartment of Biology, University of Bergen, Box 7800 N-5020 Bergen, Norway.

^lNorwegian Institute for Nature Research, NO-7485 Trondheim, Norway.

^mLaboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes (LIEBE), UMR CNRS 7146, U.F.R. Sci. F.A., Campus Bridoux, Université Paul Verlaine, Avenue du Général Delestraint F 57070 Metz, France..

ⁿDepartment of Environmental and Geographical Science, Manchester Metropolitan University, Manchester M1 5GD, UK.

Abstract

Evidence from an international survey in the Atlantic biogeographic region of Europe indicates that chronic nitrogen deposition is reducing plant species richness in acid grasslands. Across the deposition gradient in this region (2-44 kg N ha⁻¹ yr⁻¹) species richness showed a curvilinear response, with greatest reductions in species richness when deposition increased from low levels. This has important implications for conservation policies, suggesting that to protect the most sensitive grasslands resources should be focussed where deposition is currently low. Soil pH is also an important driver of species richness indicating that the acidifying effect of nitrogen deposition may be contributing to species richness reductions. The results of this survey suggest that the impacts of nitrogen deposition can be observed over a large geographical range.

Keywords: Acid grasslands, acidification, atmospheric nitrogen deposition, soil pH, species richness

Introduction

In recent years the global threat posed by atmospheric nitrogen (N) deposition has become clear (Sala et al., 2000; Galloway et al., 2008; Bobbink et al., 2010), but to date, impacts of N deposition on the biodiversity and ecosystem function in semi-natural environments have only been demonstrated at local and national scales (Stevens et al., 2004; Jones et al., 2004; Smart et al., 2005; Maskell et al., 2010). The deposition of reactive N has more than doubled over the last one hundred years as a result of agricultural intensification and increased burning of fossil fuels by traffic and industry (Galloway et al., 2004; Fowler et al., 2005). Atmospheric deposition of reactive N has the potential to enrich the N content of soils, resulting in increased plant growth and hence competition for light (Bobbink et al., 1998; Hautier et al., 2009) and other resources, and to acidify soils reducing the number of species that can tolerate these conditions and coexist (Schuster and Diekmann, 2003). Globally, the deposition of reactive N is predicted to increase in the future due to the expanding global population leading to increased demand for food and increased use of fossil fuels (Tilman et al., 2002; Dentener et al., 2006). The potential loss of biodiversity as a result of N deposition has important implications for both environmental and agricultural policy.

In 2004, Stevens et al. identified a linear decline in plant species richness of acid grasslands in Great Britain associated with long-term chronic N deposition. This has since been demonstrated in other habitats in Great Britain such as heathlands, calcareous grasslands and dune grasslands (Maskell et al., 2010; Jones et al., 2004). However, until now there has been little research showing a) what happens at levels of deposition lower than those found in Great Britain b) how important N deposition is as a driver of species richness and c) whether the losses of biodiversity reported by Stevens et al. (2004) are occurring on a larger, international scale.

To address these research needs, we surveyed 153 semi-natural acid grasslands belonging to the *Violion caninae* alliance (Schwickerath, 1944) on a transect across the Atlantic biogeographic zone of Europe with total atmospheric N deposition ranging from 2.4 to 43.5 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ (Fig. 1), covering much of the range of deposition found in the industrialised world. *Violion caninae* grasslands are widespread across Western Europe, but changes in land use have decreased their cover in some regions (Ellenberg, 1996). They are economically valuable providing a number of ecosystem services including extensive sheep and cattle grazing in some regions, and are important for biodiversity supporting a range of plants, invertebrates and mammals. These grasslands are dominated by species such as *Agrostis capillaris*, *Festuca ovina* and *rubra*, *Potentilla erecta* and *Galium saxatile*, typically with a dense sward where species are intimately mixed.

Grasslands were surveyed in Atlantic regions of Great Britain, Isle of Man, Ireland, France, Germany, Belgium, the Netherlands, Denmark, Sweden and Norway (Fig. 1). All of the grasslands were surveyed between 2002 and 2007 using a consistent methodology; all were unfertilised and many were in areas protected for nature conservation.

Materials and methods

Field methodology

Between 2002 and 2007 153 acid grasslands belonging to the *Violion caninae* alliance (Schwickerath, 1944) were surveyed within the Atlantic biogeographic zone of Europe. All grasslands were surveyed between May and September. The survey consisted of: nine grasslands in Belgium, three grasslands in Denmark, twenty-five grasslands in France, twelve grasslands in Germany, eleven grasslands in Ireland, Northern Ireland and the Isle of Man, seven grasslands in the Netherlands, nine grasslands in Norway, four grasslands in Sweden and seventy-seven grasslands in Great Britain. The large number of sites surveyed in Great Britain derives from the intensive national survey of the earlier work and the fact that *Violion caninae* grasslands cover a much larger area than in other countries in the study (Stevens et al., 2004).

The grasslands were selected to cover the range of atmospheric N deposition in Europe and to give a good range of sites at different latitudes and longitudes for different deposition values. Grasslands surveyed were not agriculturally improved or in the vicinity of a point source of N and were managed by grazing or cutting. Within each site, five randomly located 4m² quadrats were surveyed, avoiding areas of vegetation belonging to a different community (e.g. areas of shrub) or were strongly affected by animals, tracks and paths, or were in the rain shadows of trees or hedges. Within each quadrat all vascular plants and bryophytes were identified to species level and percent cover was estimated by eye. A description of the site was made including latitude, longitude, aspect, slope, extent of grassland, soil depth and surrounding vegetation communities.

Soil samples were collected from each quadrat. Topsoil samples (0-10 cm below the litter layer) were taken from two opposing corners of the quadrat using a trowel and bulked to give one sample per quadrat. Subsoil samples (20-30 cm deep or as deep as possible in shallow soil) were taken from the centre of the quadrat using a 5 cm diameter soil auger. All soil samples were kept cool during transit and air dried on return to the laboratory.

For each site, N and sulphur deposition data were modelled using the EMEP-based IDEM model (Pieterse et al., 2007) or national deposition models depending on which were available in each of the countries surveyed. Full details are given below. Meteorological data were obtained from the European Space Agency Monitoring Agriculture with Remote Sensing (MARS) unit (Monitoring Agricultural Resources, 2009); ten year averages were calculated for each site for mean annual potential transpiration from crop canopy, mean minimum daily temperature, mean maximum daily temperature and mean annual rainfall. Radiation index was calculated based on aspect, slope and latitude according to Oke (1987).

Laboratory Methodology

All analyses were conducted on air-dried soils due to the large number and geographical spread of sites being surveyed (MAFF, 1986). Soil pH was determined using a pH probe in a 1:5 soil and deionised water mixture.

Nitrate, ammonium, calcium and aluminium concentrations were determined using two different methods. For samples collected in 2002 and 2003 from Great Britain, soils were extracted with 1 M KCl and analysed using an ion chromatograph. Soil samples collected in 2007 were shaken with 0.4 M NaCl and analysed using an auto-analyser. All extracts were determined using a 1:10 soil and extractant mixture. Aluminium and calcium concentrations were determined using an ICP-MS. Stored soil samples from the earlier survey were analysed using the methodology of the later survey showing that results of the two extraction methodologies were comparable. Phosphorus availability was determined using a standard Olsen extraction and colourimetric determination (MAFF, 1986). Total C and N content of the soil was determined using a CN elemental analyser by combustion and gas detection.

Deposition models

For all of the sites visited, the best available deposition model was used for estimating the deposition of nitrogen and sulphur (S), resulting in some variation in the models used. National models were used for Germany (Gauger et al., 2002), the Netherlands (van Jaarsveld, 1995; van Jaarsveld; 2004; Asman and van Jaarsveld, 2004) and Great Britain (NEGTAP; 2004).

For all other countries the EMEP-based IDEM (Pieterse et al., 2007) models were used. The different model use similar approaches to model reduced and oxidised deposition.

Comparison between the models showed that these models provided the best estimates of deposition across the region. For all of the models, deposition was calculated as a three-year average to provide a more robust estimate of longer-term nitrogen inputs.

Statistical analysis

For all analyses mean values from the five samples per site were used. Simple regression and forward and backward multiple regressions were conducted using SPSS v17. All variables were checked for normality and corrected if necessary (Table 1) and strongly inter-correlated independent variables ($r > 0.5$) were removed from the models. The variables to be retained were selected based on ecological relevance. Soil ammonia concentration and plant available P concentration were highly skewed and correction did not result in a normal distribution. In these cases the model was run with and without these variables included. In each case, results did not differ between model runs so they were excluded from the analysis. The regression tree was analysed in R according to the method set out in Crawley (2007) and variance partitioning using stepwise multiple regression were analysed in Minitab.

Results

Examining the relationship between atmospheric N deposition and species richness shows a significant negative linear relationship (linear regression $r^2 = 0.36$, $p < 0.001$). The distribution of sampling sites differs between countries and Great Britain contributes a large proportion of the overall data set. However, when data for Great Britain is removed from the regression model, the relationship remains significant ($r^2 = 0.28$, $p < 0.001$). Analysis of covariance shows that the intercept of the regression line for mainland European species richness differs significantly from the regression line for the Great Britain ($p < 0.001$), but gradients of the two regression lines for the relationship between N deposition and species richness are not significantly different.

Table 1. Variables recorded in this study. Variables entered into the regression models are shown in bold. Some variables had to be excluded due to correlation with other variables or data distributions that were too strongly skewed for analysis. Variables that did not show a normal distribution were log (Ln) – transformed.

Variable	Range
Dependent variable	
Species richness (mean number of species per five 4m² quadrats)	6.4 – 33.2
Deposition variables	
Total inorganic N deposition (kg N ha⁻¹ yr⁻¹)	2.4 - 43.5
Total inorganic S deposition (kg N ha⁻¹ yr⁻¹)	2.2 – 19.6
Geographical and physical variables	
Longitude	-9.951 – 13.25
Latitude	43.303 – 60.697
Altitude (m)	4 – 812 (Ln)
Inclination (°)	0 - 60
Aspect (°)	0 - 350
Vegetation height (cm)	1.5 - 40
Radiation index	-0.43 – 0.99
Mean maximum daily temperature (°C)	6.8 – 18.8
Mean minimum daily temperature (°C)	0.6 – 10.2
Mean annual rainfall (mm)	498 - 1971
Mean annual potential transpiration from canopy (mm)	487 - 834
Soil variables	
Topsoil pH	3.7 – 5.7
Subsoil pH	3.3 – 6.1
Extractable aluminium concentration (mg kg⁻¹ dry soil)	2.3 – 1319 (Ln)
Extractable ammonium concentration (mg kg⁻¹ dry soil)	0 - 305
Extractable nitrate concentration (mg kg⁻¹ dry soil)	0 – 172 (Ln)
Olsen P (mg kg ⁻¹ dry soil)	0 - 86
C (%)	0.03 – 40.63
N (%)	0.09 – 22.89
C:N ratio (%/%)	8.9 – 30.5
Ca:Al ratio (g/g)	0.01 – 20.49
Management variables	
Management type	Cutting / grazing
Management intensity (estimated from standing crop biomass)	High, medium and low

The relationship between N deposition and species richness is better fitted with a negative exponential curve giving an r^2 of 0.40 ($p < 0.0001$, Fig. 1). This shows a potentially greater loss of species richness when deposition increases from a low background level than a high level.

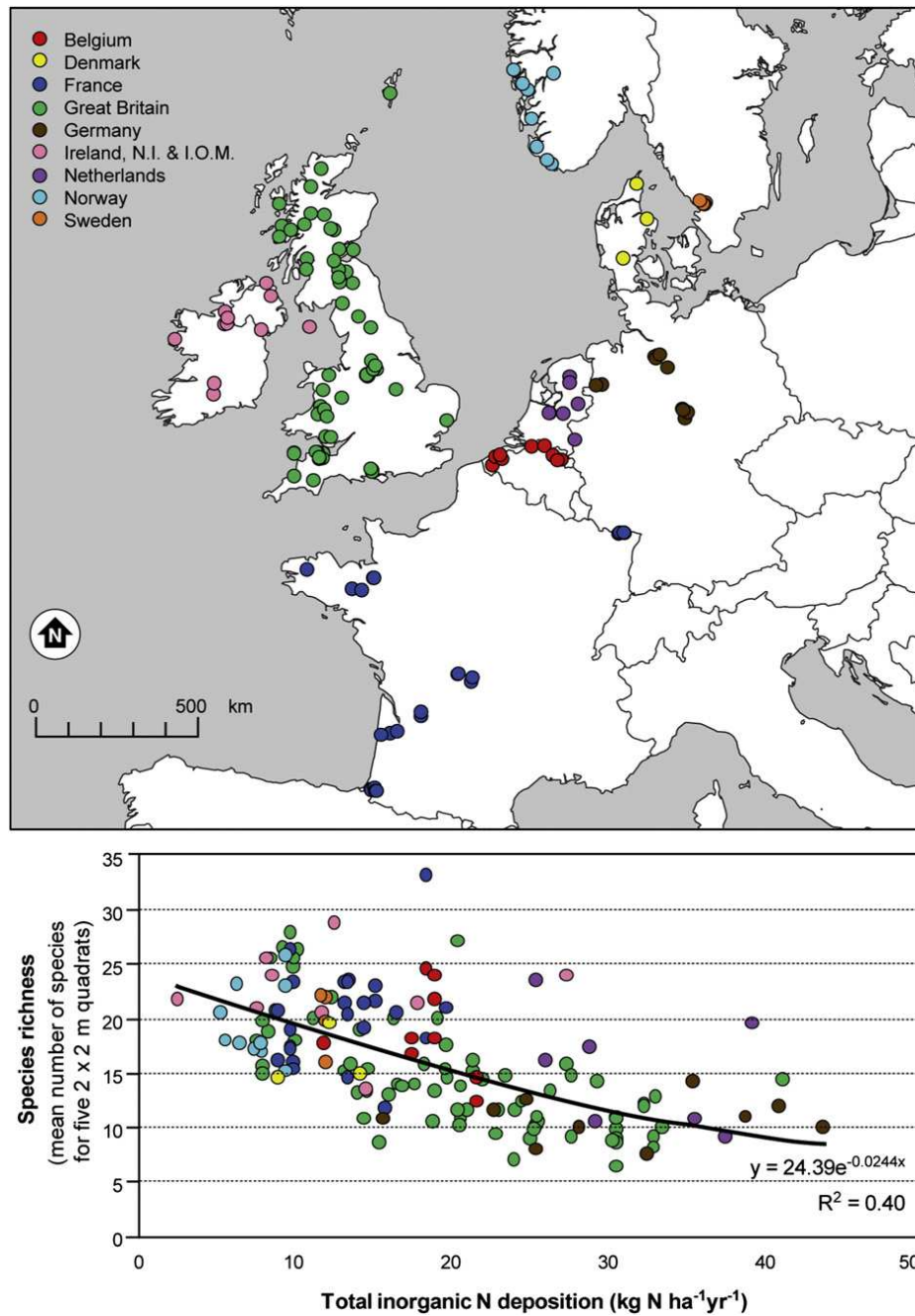


Fig. 1. Map of acid grasslands surveyed in the Atlantic Biogeographic region of Europe and graph showing total plant species richness (mean number of species in five 2 by 2 m quadrats per site) against total inorganic N deposition for each of the countries surveyed: Belgium (red), Denmark (yellow), France (dark blue), Great Britain (green), Germany (brown), Ireland, Northern Ireland and Isle of Man (pink), Netherlands (purple), Norway (turquoise) and Sweden (orange). The curvilinear relationship between N deposition and species richness is shown.

Most of the decline in species richness is accounted for by a reduction in forb species richness, with grass richness and bryophyte richness showing weaker but still significant negative relationships with N deposition (forbs: $r^2=0.31$, $p<0.001$ (exponential relationship) grass: $r^2 = 0.27$, $p<0.001$ (linear relationship), bryophyte: $r^2 = 0.05$, $p<0.005$ (linear relationship); Fig. 2).

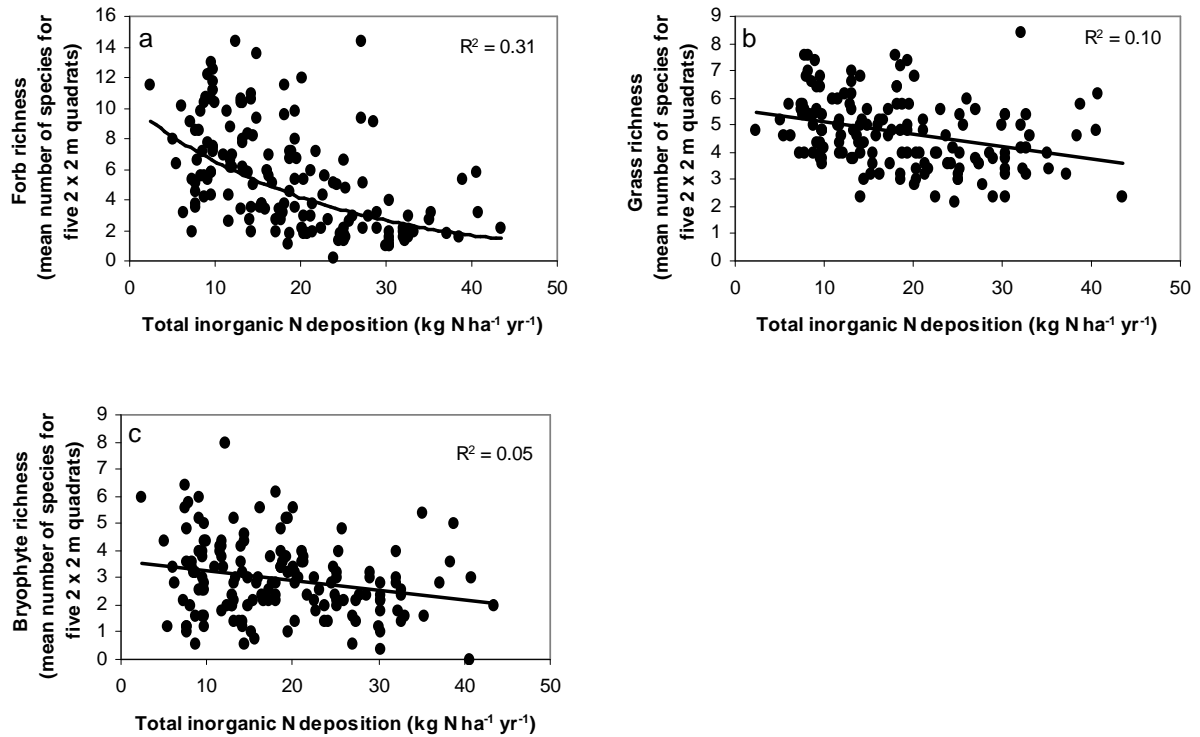


Fig. 2. a) Forb richness (curvilinear relationship) b) grass richness (linear relationship) and c) bryophyte richness (linear relationship) (mean number of species in five 2 by 2 m quadrats per site) against total inorganic N deposition (kg N ha⁻¹ yr⁻¹) for 153 acid grasslands surveyed in the Atlantic Biogeographic region of Europe.

Multiple regression (forward and backward stepwise regression) was used to identify additional drivers of species richness in this data set. Correlated variables were removed and corrections for non-normality applied, leaving a set of sixteen variables for analysis (Table 1). Multiple regression showed that total inorganic N deposition, topsoil pH, radiation index and extractable soil nitrate concentration (log transformed for normality) explained a total of 55% of the variation in species richness (Eq. 1):

$$\begin{aligned} \text{Species richness} = & 0.210 + 5.038 (\text{Topsoil pH}) \\ & - 0.243 (\text{N deposition}) \\ & - 3.978 (\text{Radiation index}) \\ & - 0.304 (\ln \text{NO}_3^-) \end{aligned} \quad (1)$$

Topsoil pH showed the strongest linear correlation with species richness, with an r^2 of 0.38 ($p < 0.001$) (Fig. 3a). As topsoil pH is influenced by site physical characteristics and N deposition, this correlation may be related to acidification of the soils, but the approach does not distinguish between the sources of acidification which include sulphur deposition. Indeed, there is a significant relationship between soil pH and N deposition ($r^2 = 0.20$, $p < 0.001$) (Fig. 3b) although as a result of the variability of soil types in this study and the large amount of variation in soil pH that is independent of N deposition, it was not necessary to remove this variable from the analysis. There was also a significant correlation between soil pH and S deposition ($r^2 = 0.18$, $p < 0.001$).

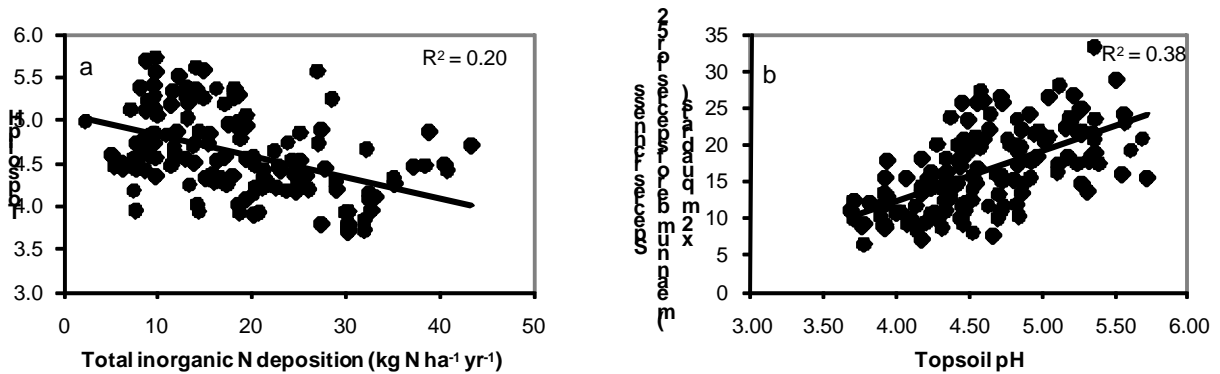


Fig. 3. a) Topsoil pH against plant species richness (mean number of species in five 2 by 2 m quadrats per site), b) topsoil pH against total inorganic N deposition ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) for 153 acid grasslands surveyed in the Atlantic Biogeographic region of Europe.

A regression tree confirmed the primary importance of N deposition as a driver of species richness. The division in the regression shows that at high deposition (greater than $20.3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$), topsoil pH is the next most significant variable, followed by soil nitrate concentration, but at deposition less than $20.3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, extractable aluminium concentration is the next most significant.

Discussion and conclusions

The results of this large scale survey suggest that the impacts of N deposition can be observed over a large geographical range and are not restricted to Great Britain, as initially demonstrated by Stevens et al. (2006). Analysis of covariance shows that the gradients of the two regression lines for the relationship between N deposition and species richness are not significantly different, implying that the species richness of grasslands in the two regions are equally sensitive to N deposition.

The results of this investigation are consistent with those found by Duprè et al. (2010) who conducted a temporal analysis of changes in species richness in the same grassland type. They found that during the last 70 years, species richness in Great Britain, Germany and the Netherlands have all declined significantly in relation to estimated cumulative N deposition. These results provide further evidence for declines in species richness related to chronic atmospheric N deposition and support the use of a space for time substitution for detecting the effects of N deposition.

The curvilinear relationship found in this investigation implies that small increases in N deposition will have a larger impact when background deposition levels are low or moderate than when initial deposition levels are higher (above $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, reflecting the point for splitting the data identified in the regression tree (Fig. 4)). These results support the experimental findings of Clark and Tilman (2008), who demonstrated the potential for species loss in prairie grasslands as a result of chronic low-level deposition. Below $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$,

linear regression indicates that a deposition rate of $2.3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ reduces species richness by one species per 4 m^2 quadrat. Above 20, $3.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ is tolerated before species richness is reduced by the same amount. Such a relationship indicates that at high deposition, many of the species sensitive to N deposition may have already declined leaving mainly the less nitrogen-sensitive species. These findings have important implications for conservation and restoration suggesting that to protect the most sensitive grasslands, resources should be focussed on protecting areas that are as yet relatively undamaged by N deposition, since the potential for species loss in these areas is greater (Emmett, 2007). There may also be important repercussions for the regulation of point source emissions of pollutants. Current legislation aims to maintain deposition below the critical load for N deposition (currently $10\text{--}20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ for acid grassland communities (Bobbink et al., 2003), but the results of this study indicate that increasing deposition by very small amounts where background levels are low will result in reductions in species richness, even if the total deposition to the site (diffuse source plus point source) remains below the critical load. It is also important to note that even where the critical load is exceeded by background deposition, the addition of further N from a point source may still result in a reduction of species richness, even at high levels of deposition.

The majority of the decline in species richness is accounted for by a loss of forbs. This decline in forb species richness is the same trend as identified in earlier acid grassland surveys in Great Britain (Stevens et al., 2004; Stevens et al., 2006; Stevens et al., 2009) and is consistent with experimental N additions in other grassland types (e.g. Bobbink et al., 1991; Mountford et al., 1993; Wedin and Tilman, 1996) and historical studies (Dupre et al., 2010). The wedge shaped distribution observed for forbs and bryophytes indicates that at low deposition richness can be both high and low, but at high deposition high richness is not observed. A loss of species richness within the grassland sward potentially has wide implications for biodiversity further up the food chain (Throop and Ler dau, 2004; Weiss, 1999) as well as an impact on ecosystem functioning and ecosystem service provision.

The results of this study demonstrate the importance of soil pH as a driver of species richness. Of the variables examined, topsoil pH showed the strongest linear correlation with species richness, with an r^2 of 0.38 ($p < 0.001$) (Fig. 3a). As soil pH is reduced the forms and availability of nutrients and potentially toxic metals are affected, reducing the pool of species able to survive (Tyler, 2003). S deposition also shows a significant negative relationship with topsoil pH ($r^2 = 0.18$, $p < 0.001$) showing that both N and S deposition (or their legacy) remain important drivers of soil pH.

Variance partitioning allows assessment of the relative contributions of different groups of variables to the total variation in species richness. This analysis showed that both a site's geographical and physical characteristics (Table 1), and its management type and intensity, exclusively explain very little of the variation in species richness ($r^2 = 0.004$ and

0.003, respectively). These small numbers reflect the tightly defined plant community type and the similarities in management practices across the transect. Soil variables exclusively explain 13.9% of the variation in species richness and deposition variables explain 6.9% of the variation in species richness, indicating that N deposition modifies the response of the plant community to site characteristics. However, the potential for N deposition to influence soil variables means that these two sets could be considered together. The sum of the variation in species richness explained exclusively and variation explained by N deposition and soil in combination is 53% of the variation in species richness.

The regression tree (Fig. 4) sheds further light on the interaction between independent variables. In the regression tree, the first division is with N deposition, reflecting the importance of this variable as a driver of species richness with pH and aluminium as the next most significant variables. Aluminium may be a more important driver of species richness at low deposition because here, species intolerant of aluminium toxicity have yet to be eliminated by acidification. The acid substrate in these habitats means that availability of aluminium in the soil can change greatly with small changes in soil pH. Below this level of the regression tree, other variables become important. pH is clearly a very important driver of species richness in these grasslands and soil acidification is likely to be playing an important role in the reduction of species richness. This was also found in analysis of temporal trends in species richness in relation to N deposition (Dupre et al., 2010).

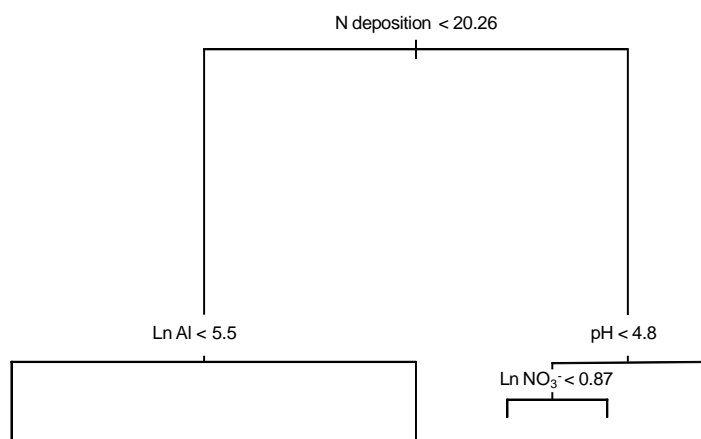


Fig. 4. Regression tree showing relationships between species richness and dependent variables (Table 1) using dichotomous partitioning criteria. Variables in the regression tree are: total inorganic N deposition ($\text{kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) (N deposition), topsoil pH (pH), \ln soil KCl extractable aluminium concentration (mg kg^{-1}) ($\ln \text{Al}$) and \ln soil KCl extractable nitrate concentration (mg kg^{-1}) ($\ln \text{NO}_3^-$).

Conclusion

The results of this large-scale survey indicate that chronic nitrogen deposition is reducing plant species richness in acid grasslands. Across the deposition gradient in the Atlantic biogeographic region of Europe species richness showed a curvilinear relationship with N deposition, with greatest differences in species richness where deposition increased

from low levels. Given the large range over which we observe reduced species richness associated with high N deposition, the similar relationships that have been observed in other habitats (Maskell et al., 2010) and the results of experimental N additions in a wide range of habitats (e.g. Power et al., 1998; Morecroft et al., 1994; Carroll et al., 2000; Jones et al., 2004; Pilkington et al., 2005), it is reasonable to assume that N deposition represents a global threat to the biodiversity of semi-natural ecosystems.

Acknowledgements

This project was funded by the European Science Foundation through the EURODIVERSITY-programme, and national funds were provided by DfG (Germany), NERC (United Kingdom) and NWO (The Netherlands) and INRA, ADEME and Aquitaine Region (France). We are grateful to everyone who assisted with field and laboratory work, and conservation agencies and land owners who gave permission for sampling.

References

- Asman, W.A.H., van Jaarsveld J.A., 2002. A variable-resolution transport model applied for NH_x in Europe. *Atmospheric Environment*, 26A, 445-464.
- Bobbink R., 1991. Effects of nutrient enrichment in Dutch chalk grassland. *Journal of Applied Ecology*, 28, 28-41.
- Bobbink R., Hornung M., Roelofs J.G.M., 1998. The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology*, 86, 717-738.
- Bobbink R., Hicks K., Galloway J., Spranger T., Alkemade R., Ashmore M., Bustamante M., Cinderby S., Davidson E., Dentener F., Emmett B., Erisman J.W., Fenn M., Gilliam F., Nordin A., Pardo L., De Vries W., 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*, 20, 30-59.
- Clark C.M., Tilman D., 2008. Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, 451, 712-715.
- Crawley, M.J., 2007. *The R Book*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Dentener F., Stevenson D., Ellingsen K., van Noije T., Schultz M., Amann M., Atherton C., Bell N., Bergmann D., Bey I., Bouwman L., Butler T., Cofala J., Collins B., Drevet J., Doherty R., Eickhout B., Eskes H., Fiore A., Gauss M., Hauglustaine D., Horowitz L., Isaksen I.S.A., Josse B., Lawrence M., Krol M., Lamarque J.F., Montanaro V., Muller J.F., Peuch V.H., Pitari G., Pyle J., Rast S., Rodriguez J., Sanderson M., Savage N.H., Shindell D., Strahan S., Szopa S., Sudo K., Van Dingenen R., Wild O., Zeng G., 2006. The global atmospheric environment for the next generation. *Environmental Science & Technology*, 40, 3586-3594.
- Dupre, C., Stevens, C.J., Ranke, T., Bleeker, A., Peppler-Lisbach, C., Gowing, D.J.G., Dise, N.B., Dorland, E., Bobbink, R., Diekmann, M., 2010. Changes in species richness and

- composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, 16, 344-357.
- Ellenberg, H., 1996. *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*, 5th edn. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Emmett, B.A., 2007. Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems: Some recent findings and their implications for our conceptual framework. *Water Air and Soil Pollution Focus*, 7, 99-109.
- Fowler, D., Muller, J.B.A., Hayman, G., Vincent K.J., 2005. Changes in the atmospheric deposition of acidifying compounds in the UK between 1986 and 2001. *Environmental Pollution*, 137, 15-25.
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vorosmarty, C.J., 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153-226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P. Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science*, 320, 889-892.
- Gauger, T., Anshelm, F., Schuster, H., Erisman, J.W., Vermeulen, A.T., Draaijers, G.P.J., Bleeker, A., Nagel, H.-D., 2002. Mapping of ecosystems specific long-term trends in deposition loads and concentrations of air pollutants in Germany and their comparison with Critical Loads and Critical Levels. In: Institut fur Navigation, University of Stuttgart Germany.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A., Hector A., 2009. Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science*, 324, 636-638.
- Jones, M. L. M., Wallace, H. L., Norris, D., Brittain, S. A., Haria, S., Jones, R. E., Rhind, P. M., Reynolds, B. R., Emmett, B. A., 2004. Changes in vegetation and soil characteristics in coastal sand dunes along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Plant Biology*, 6, 598-605.
- MAFF, 1986. *The analysis of Agricultural Materials*. Third Edition edn. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Monitoring Agricultural Resources (MARS), 2009. European Commission Joint Research Centre. URL <http://mars.jrc.it/mars/About-us/The-MARS-Unit>.
- Maskell, L.C., Smart, S.M., Bullock, J.M., Thompson, K. & Stevens, C.J., 2010. Nitrogen Deposition causes widespread species loss in British Habitats. *Global Change Biology*, 16, 671-679.
- Morecroft, M. D., Sellers, E. K., Lee, J. A., 1994. An experimental investigation into the effects of atmospheric deposition on two semi-natural grasslands. *Journal of Ecology*, 82, 475-483.
- Mountford, J.O., Lakhani, K.H., Kirkham F.W., 1993. Experimental assessment of the effects of nitrogen addition under hay-cutting and aftermath grazing on the vegetation of meadows on a Somerset peat moor. *Journal of Applied Ecology*, 30, 321-332.

- NEGTAP, 2001. Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK. CEH Edinburgh.
- Oke, T.R., 1987. Boundary layer climates. 2nd ed. Methuen, New York.
- Pieterse ,G., Bleeker, A., Vermeulen, A.T., Wu, Y., Erisman, J.W., 2007. High resolution modelling of atmosphere-canopy exchange of acidifying and eutrophying components and carbon dioxide for European forests. *Tellus*, 59B, 412-424.
- Pilkington, M. G., Caporn, S. J. M., Carroll, J. A., Cresswell, N., Lee, J. A., Emmett, B. A., Johnson, D., 2005. Effects of increased deposition of atmospheric nitrogen on an upland Calluna moor: N and P transformation. *Environmental Pollution*, 135, 469-480.
- Power, S. A., Ashmore, M. R., Cousins, D. A., 1998. Impacts and fate of experimentally enhanced nitrogen deposition on a British lowland heath. *Environmental Pollution*, 102, 27-34.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287, 1770-1774.
- Schuster, B., Diekmann, M., 2003. Changes in species density along the soil pH gradient - Evidence from German plant communities. *Folia Geobotanica*, 38, 367-379.
- Schwickerath, M., 1944. Das Hohe Venn und seine Randgebiete. *Pflanzensoziologie*, 6, 1-278.
- Smart, S.M., Bunce, R.G.H., Marrs, R.H., LeDuc, M., Firbank, L.G., Maskell, L.C., Scott, W.A., Thompson, K., Walker K.J. 2005. Large-scale changes in the abundance of common higher plant species across Britain between 1978, 1990 and 1998 as a consequence of human activity: tests of hypothesised changes in trait representation *Biological Conservation*, 124, 355-371.
- Stevens, C.J., Dise, N.B., Mountford, J.O. & Gowing, D.J., 2004. Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science*, 303, 1876-1879.
- Stevens, C.J., Dise, N. B., Gowing, D. J., Mountford, J. O. 2006. Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology*, 12, 1823-1833.
- Stevens, C.J., Maskell, L.C., Smart, S.M., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Gowing, D.J., 2009. Identifying indicators of atmospheric nitrogen deposition impacts in acid grasslands. *Biological Conservation*, 142, 2069-2075.
- Throop, H.L., Lerdau, M.T. 2004. Effects of nitrogen deposition on insect herbivory: implications for community and ecosystem processes. *Ecosystems*, 7, 109-133.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418.
- Tyler, G. 2003. Some ecophysiological and historical approaches to species richness and calcicole/calcifuge behaviour - Contribution to a debate. *Folia Geobotanica*, 38, 419-428.
- Van Jaarsveld, J.A., 1995. Modelling the long-term atmospheric behaviour of pollutants on various spatial scales. PhD thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

- Van Jaarsveld, J.A., 2004. The operation priority substances model. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Report No. 500045001/2004 Bilthoven, The Netherlands.
- Wedin, D., Tilman, D., 1996. Influence of nitrogen loading and species composition on the carbon balance of grasslands. *Science*, 274, 1720-1723.
- Weiss, S.B., 1999. Cars, cows, and checkerspot butterflies: Nitrogen deposition and management of nutrient-poor grassland for a threatened species. *Conservation Biology*, 13, 1746-1486.

-ANNEXE 2-

Article 2 Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition

Carly Stevens, Cecilia Duprè, Cassandre Gaudnik, Edu Dorland, Nancy Dise, David Gowing, Albert Bleeker, Didier Alard, Roland Bobbink, David Fowler, Vigdis Vandvik, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Per Arild Aarrestad, Serge Muller & Martin Diekmann

Journal of Vegetation Science (2011) 22: 207–215

Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition

Stevens, Carly^{1,2*}; Duprè, Cecilia^{3,15}; Gaudnik, Cassandre^{4,16}; Dorland, Edu^{5,6,17}; Dise, Nancy^{7,18}; Gowing, David^{1,19}; Bleeker, Albert^{8,20}; Alard, Didier^{4,21}; Bobbink, Roland^{8,22}; Fowler, David^{10,23}; Vandvik, Vigdis^{11,24}; Corcket, Emmanuel^{4,25}; Mountford, J. Owen^{12,26}; Aarrestad, Per Arild^{13,27}; Muller, Serge^{14,28} and Diekmann, Martin^{3,29}.

¹Department of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

²Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK.

³Institute of Ecology, FB 2, University of Bremen, Leobener Str., DE-28359 Bremen, Germany.

⁴Université de Bordeaux, UMR 1202 BioGeCo, Bât B8 RdC, Av des Facultés, F-33405 Talence, France.

⁵KWR Watercycle Research Institute, P.O.Box 1072, 3430 BB Nieuwegein, The Netherlands

⁶Staatsbosbeheer, Postbus 1300, 3970 BH Driebergen, The Netherlands.

⁷Department of Environmental and Geographical Science, Manchester Metropolitan University, Manchester M1 5GD, UK.

⁸Department of Air Quality & Climate Change, Energy Research Centre of the Netherlands, PO Box 1, 1755, ZG Petten, The Netherlands.

⁹B-WARE Research Centre, Radboud University, PO Box 9010, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands.

¹⁰Centre for Ecology and Hydrology, Bush Estate, Penicuik, Midlothian, EH26 0QB, UK.

¹¹Department of Biology, University of Bergen, Box 7800 N-5020 Bergen, Norway.

¹²Centre for Ecology & Hydrology, MacLean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, Oxfordshire, OX10 8BB, UK.

¹³Norwegian Institute for Nature Research, NO-7485 Trondheim, Norway.

¹⁴Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes (LIEBE), UMR CNRS 7146, U.F.R. Sci. F.A., Campus Bridoux, Université Paul Verlaine, Avenue du Général Delestraint F 57070 Metz, France.

¹⁵E-mail dupre@uni-bremen.de; ¹⁶ E-mail c.gaudnik@ecologie.u-bordeaux1.fr; ¹⁷ E-mail edu.dorland@kwrwater.nl; ¹⁸ E-mail n.dise@mmu.ac.uk; ¹⁹ E-mail d.j.gowing@open.ac.uk; ²⁰ E-mail a.bleeker@ecm.nl; ²¹ E-mail d.alard@ecologie.u-bordeaux1.fr; ²² E-mail r.bobbink@b-ware.eu; ²³ E-mail dfo@ceh.ac.uk; ²⁴ E-mail vigdis.vandvik@bio.uib.no; ²⁵ E-mail e.corcket@ecologie.u-bordeaux1.fr; ²⁶ E-mail om@ceh.ac.uk; ²⁷ E-mail per.a.aarrestad@nina.no; ²⁸ E-mail muller@univ-metz.fr; ²⁹ E-mail mdiekman@uni-bremen.de

*Corresponding author: Fax +44 (0)1908 654167; E-mail c.j.stevens@open.ac.uk

Abstract

Question: Which environmental variables affect floristic species composition of acid grasslands in the Atlantic biogeographic region of Europe along a gradient of atmospheric N deposition?

Location: Transect across the Atlantic biogeographic region of Europe including Ireland, Great Britain, Isle of Man, France, Belgium, the Netherlands, Germany, Norway, Denmark, and Sweden.

Materials and Methods: In 153 acid grasslands we assessed plant and bryophyte species composition, soil chemistry (pH, base cations, metal, nitrate and ammonium concentrations, total carbon and nitrogen, and Olsen plant available phosphorus), climatic variables, N deposition and S deposition. Ordination and variation partitioning were used to determine the relative importance of different drivers on the species composition of the studied grasslands.

Results: Climate, soil and deposition variables explained 24% of the total variation in the species composition. Variance partitioning showed that soil variables explained the most variation in the data set and that climate and geographic variables accounted for slightly less variation. Deposition variables (N and S deposition) explained 9.8% of the variation in the ordination. Species positively associated with N deposition included *Holcus mollis*, and *Leontodon hispidus*. Species negatively associated with N deposition included *Agrostis curtisii*, *Leontodon autumnalis*, *Campanula rotundifolia*, and *Hylocomium splendens*.

Conclusions: Although secondary to climate gradients and soil biogeochemistry, and not as strong as for species richness, the impact of N and S deposition on species composition can be detected in acid grasslands influencing community composition both directly and indirectly, presumably through soil mediated effects.

Keywords: Acid grassland, Climate, Nitrogen deposition, Ordination, Soil biogeochemistry, Variation partitioning, *Violion caninae*

Introduction

The global nitrogen (N) cycle has been transformed by human activities. The global creation of reactive N increased by a factor of ten from 15 to 156 Tg N yr⁻¹ between 1860 and 1995 and by a further 31 to 187 Tg N yr⁻¹ between 1995 and 2005 (Galloway et al. 2008). With continued growth of the world population and increasing demand for food, pressures on the global N cycle are set to increase. Excess reactive N in the atmosphere is deposited to terrestrial and aquatic ecosystems as wet and dry deposition. Atmospheric deposition of reactive N is considered a global threat to biodiversity (Sala et al. 2000; Phoenix et al. 2006). Levels of N deposition in Western Europe are among the highest in the world (Galloway et al. 2008) and although there have been small declines in deposition in some regions in recent years (Fagerli & Aas 2008), deposition of N remains high in many areas and critical loads are exceeded in many parts of Europe (Galloway et al. 2008). Sulphur (S) deposition has also increased steadily through the twentieth century, peaking in the 1980s. Between 1880 and

1991 cumulative deposition of S reached 6000 kg S ha⁻¹ in high emission areas (Mylona 2002). Since then S deposition has fallen considerably as a result of political initiatives in Europe. The 1985 Helsinki Protocol on the Reduction of Sulphur Emissions or their Transboundary Fluxes and the 1994 Oslo Protocol on Further Reduction of Sulphur Emissions have achieved a 60% reduction in S emissions in Europe (1980–1997) (EMEP 1999).

N deposition has the potential to impact on grassland plant community composition in a number of different ways, resulting in changes in tissue nutrient stoichiometry and metabolism (e.g. Pitcairn et al. 1998; Gidman et al. 2006; Arroniz-Crespo et al. 2008), changes in species composition (e.g. Mountford et al. 1994; Stevens et al. 2009b), and changes in species richness (e.g. Stevens et al. 2004; Clark & Tilman 2008; Duprè et al. 2010). There are several ways in which N deposition can bring about these changes.

Because N is the limiting nutrient in many terrestrial ecosystems, the addition of N can increase primary productivity resulting in increased competition for light and other resources. This can lead to an increased dominance of competitive species that are better able to take advantage of the increased nutrients (Bobbink et al. 1998; Hautier et al. 2009). N also has the potential to acidify soils, through the deposition of nitric acid in precipitation, oxidation of dry-deposited compounds and an increase in plant uptake and N transformations in the soil. The resultant reductions in soil pH can reduce the available species pool and result in changes in species composition (Schuster & Diekmann 2003; Tyler 2003). N deposition can also result in increased susceptibility to insect herbivory (Brunsting & Heil 1985), increased incidence of drought and frost stress (Caporn et al. 2000; Sheppard & Leith 2002) and, at high air concentrations of nitrite, nitrate and ammonium, can cause leaf damage and growth reduction (Pearson & Stewart 1993) although concentrations this high are generally only found in the immediate vicinity of point sources.

The addition of N to semi-natural vegetation typically results in an increase in competitive species (Wedin & Tilman 1993; Wilson et al. 1995) or a reduction in acid intolerant species (Stevens et al. 2010b). Results from previous studies on acid grasslands have shown that species richness declined in relation to N deposition over both spatial gradients (Stevens et al. 2004; Maskell et al. 2010) and through time (Duprè et al. 2010). Changes in species richness and composition in acid grasslands in the UK have been associated with higher KCl-extractable ammonium in the soil, lower pH (Stevens et al. 2006) and higher aluminium and other metal availability in soils (Stevens et al. 2009a).

Changes in species composition in relation to N deposition have previously been examined at local and national scales in a range of habitats (e.g. Smart et al. 2003; Bennie et al. 2006) as well as in experimental manipulations (e.g. Mountford et al. 1993; Carroll et al. 2003). In this investigation, we use a survey of 153 acid grasslands belonging to the *Violion caninae* alliance (Schwickerath 1944) in ten countries within the Atlantic biogeographic

region of Europe to investigate variation in species composition and underlying explanatory variables. We examine the variation in species composition in a clearly defined community type along a long N deposition gradient (total atmospheric N deposition ranging from 2.4 to 43.5 kg N ha⁻¹ yr⁻¹), and aim to quantify the amount of variation in species composition attributed to different explanatory variables and specifically to deposition variables.

Materials and Methods

One hundred and fifty three *Violion caninae* grasslands were surveyed between 2002 and 2007 within the Atlantic biogeographic zone of Europe (Fig. 1). The acidic grasslands visited were selected in a stratified manner to cover the range of atmospheric N deposition in Europe. Grasslands in the vicinity of point sources of nitrogen (e.g. large pig or poultry farms) were avoided. All of the grasslands were managed by grazing or cutting and none were fertilized. To ensure consistent community selection across the geographic gradient, a list of indicator or dominant species of the community was drawn up that had to be found on a site before the survey was carried out. Despite the large geographical range over which the community was surveyed, there were no marked differences in the community between countries, as shown by the relatively short DCA gradient (Fig. 2). At each site, five randomly located 2 m × 2 m quadrats were surveyed within a 1-ha area. Within each quadrat, all vascular plants and bryophytes were identified to species level and their cover estimated using the Domin scale (see Rich et al. 2005). Areas within the grassland that belonged to other plant communities (according to the dominant or indicator species), those strongly affected by animals, tracks and paths, or in the rain shadows of trees or hedges were excluded from the survey. A description of the site was made and data collected on latitude, longitude, aspect, slope, extent of grassland, soil depth (to bedrock) and surrounding vegetation.

Soil samples were collected from each quadrat. Topsoil samples were taken at a depth of 0-10 cm below the litter layer. Samples were taken from two opposing corners of the quadrat, bulked to make one sample per quadrat and kept cool during transit.

In the laboratory, soil samples were air dried and ground to <2 mm prior to analysis. For total carbon (C) and N analysis, soils were ground to a fine powder. Soil pH was determined using a pH probe in a 1:5 slurry of soil:deionised water (Thomas 1996). Nitrate, ammonium, and metal concentrations were analysed using two different methods. Sixty-eight samples from the UK collected in 2002 and 2003 were leached with 1 M KCl (MAFF 1986) and the resulting nitrate and ammonium analysed using ion chromatography. Other samples were shaken with 0.4M NaCl and analysed using an auto-analyser. For all samples metal concentrations were determined using an ICP-MS. A comparison between the two methodologies demonstrated that results were comparable (not shown). Total C and N content of the soil and plant material was analysed using a CN element analyser. Plant-available phosphorus was calculated in an Olsen extraction (MAFF 1986). All samples were analysed

within 3 months of collection. Full details of soil analysis are given in Stevens et al. (Stevens et al. 2010a).

Meteorological data for all sites were obtained from the European Space Agency Monitoring Agriculture with Remote Sensing (MARS) unit (MARS 2009); 10-year averages (1996-2006) were calculated for each site for mean annual potential evapotranspiration, mean minimum daily temperature, mean maximum daily temperature and mean annual rainfall. Radiation index was calculated based on latitude, aspect and slope (Oke 1987).

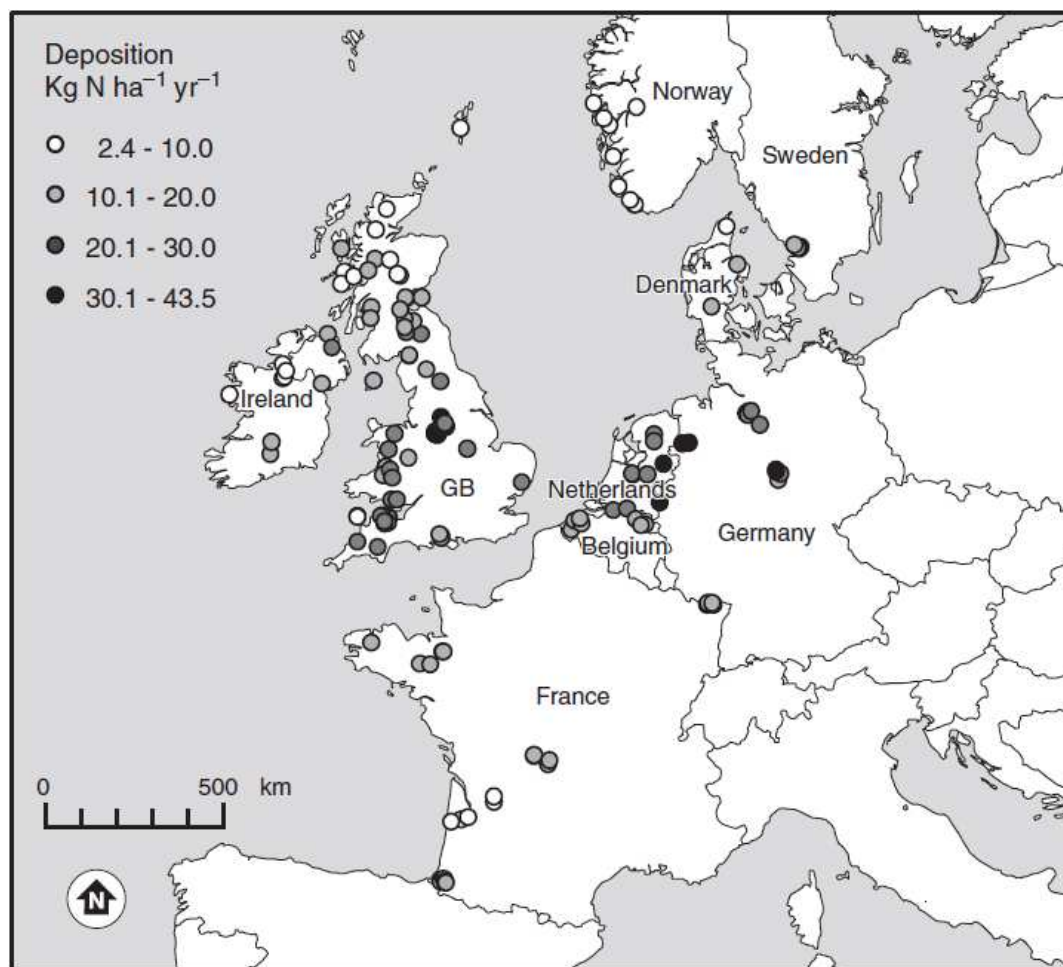


Fig. 1. Distribution of the 153 *Violion caninae* grasslands surveyed in the Atlantic biogeographic region of Europe.

For each site, total N, reduced N, oxidized N and sulphur (S) deposition data were modelled using the best available deposition model. National models were used for Germany (Gauger et al. 2002), the Netherlands (Van Jaarsveld 1995; Asman & van Jaarsveld 2002; Van Jaarsveld 2004) and the United Kingdom (Smith et al. 2000; NEG-TAP 2001). For all other countries the European Monitoring and Evaluation Programme (EMEP)-based Integrated Deposition Model (IDEM) (Pieterse et al. 2007) was used. Comparisons between models revealed that results were very similar for many areas where both models were available. The exception was areas with very variable altitude, for these areas, national

models, which have a smaller resolution than the EMEP model, were used. For all of the models, deposition was calculated as a 3-year average (2000-2003). For the five quadrats at each site, both mean Domin scores (groupings of percentage cover) and constancy values (frequency in the five quadrats) were tested and gave very similar results, so constancy scores were selected for the final analysis. Major gradients were explored using indirect gradient analysis with detrended correspondence analysis (DCA) in CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, The Netherlands). Correlation coefficients between 19 environmental variables (latitude, longitude, radiation index, inclination, management type, mean daily maximum temperature, soil pH, soil aluminium, calcium, magnesium and manganese concentrations, nitrate concentration, ammonium concentration, Olsen phosphorus concentration, total C and N content, C:N, total atmospheric N and S deposition) and site scores of DCA axes were calculated. A log-transformation was applied to some variables to achieve normality. For further analysis, highly intercorrelated variables ($r > 0.6$) were removed (altitude, radiation index, transpiration, mean daily minimum temperature, rainfall, subsoil pH, iron concentration, nitrate concentration, ammonium concentration and Olsen extractable phosphate). Latitude and temperature although highly correlated were both retained due to their potential importance as drivers of species composition on such a large geographical scale. A correlation matrix is provided in Appendix S1. To reduce the number of environmental variables, those variables that were significantly correlated with the DCA axes were selected using Minitab 15 (Minitab Inc, 2007, USA). Divalent base cations (calcium, magnesium) and manganese were added together to further reduce the number of variables (Kleinebecker et al. 2008). Sulphur deposition and soil N were retained in the analyses, as they were variables of particular interest to this investigation, although they were correlated with some other variables. These environmental variables were used in a canonical correspondence analysis (CCA) with forward selection and rare species down-weighted. Variables which did not show a significant relationship in the forward selection were removed. Variance partitioning was conducted by running a series of partial CCAs using three groups of variables: deposition, soil and climate and geographic variables (Table 1) to determine the relative contributions of each group to the overall variance (Borcard et al. 1992). CCA was performed using CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, The Netherlands).

Table 1: Grouping of variables used in variance partitioning.

Group	Variables
Deposition	Total inorganic N deposition and S deposition
Soil	Topsoil pH, exchangeable aluminium concentration, exchangeable base cation concentration, % C, %N and C:N ratio
Climate and geographic	Latitude, longitude and mean daily maximum temperature

Results

A total of 398 species were found in the 153 sites. The species recorded most frequently in the data set were *Agrostis capillaris* L. (150 sites), *Luzula campestris* (L.) DC. (128 sites), *Rhynchospora squarrosus* (Hedw.) Warnst (124 sites), *Potentilla erecta* (L.) Rauschel (116 sites) and *Galium saxatile* L. (113 sites). Grassland swards were typically grass dominated with variable amounts of forb and bryophyte cover. DCA (Fig. 2) showed good overlap between the sites surveyed in different countries but a latitudinal gradient is apparent on axis 1.

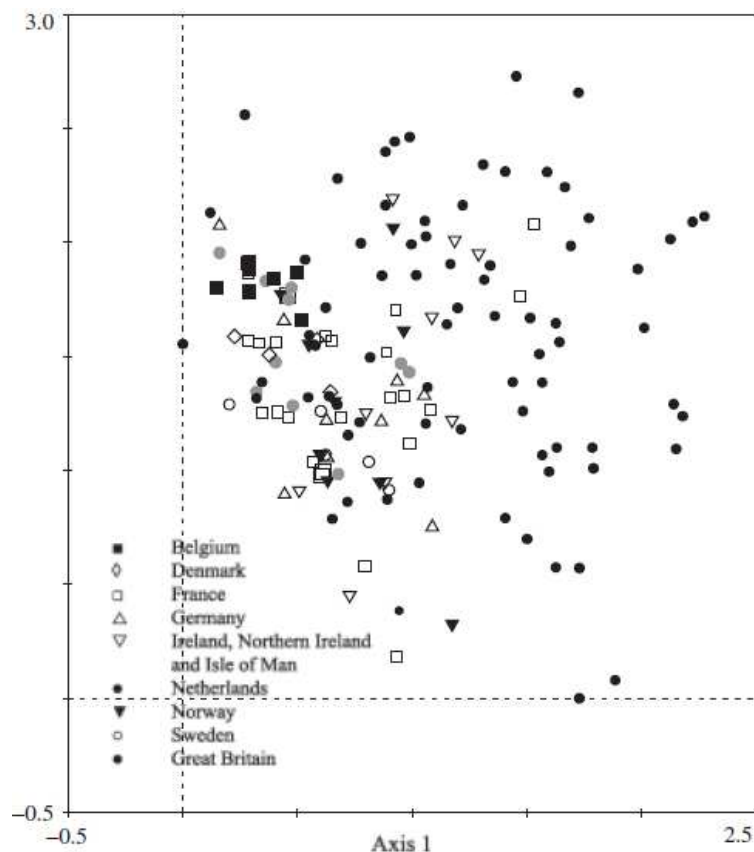


Fig. 2. DCA ordination of sites surveyed coded according to country. The gradient lengths for axes 1 and 2 are 2.73 and 2.27, respectively; eigen values are 0.236 and 0.190.

The DCA ordination analyses showed relatively short gradient lengths considering the large geographical variance in the grasslands surveyed. The gradient length of axis 1 was 2.73 and that of axis 2 was 2.27. The total inertia in the DCA was 3.006. The sample scores of axis 1 of the DCA analysis were significantly correlated with a number of variables. Significant correlations with an r value of greater than 0.4 were observed for latitude, management type, mean daily maximum temperature, topsoil pH, aluminium concentration, and C content. For axis 2 of the DCA analysis, sample scores were significantly and strongly correlated with base cation concentration and soil C:N ratio. Sample scores on axis 3 were significantly correlated with total N deposition and longitude (Table 2).

Table 2. Correlation co-efficients between DCA axis scores and environmental variables. Significant correlation coefficients are marked as: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$.

Environmental Variable	Axis 1		Axis 2		Axis 3	
Latitude	-0.649	***	0.070		0.073	
Longitude	0.294	***	-0.255	***	0.627	***
Altitude (m a.s.l.)	-0.360	***	0.155		-0.108	
Log inclination (°)	-0.398	***	0.165	*	-0.252	**
Radiation index	0.328	***	-0.042		0.118	
Mean monthly maximum temperature (°C)	0.663	***	-0.131		-0.078	
Mean monthly minimum temperature (°C)	0.468	***	-0.080		-0.290	***
Mean annual rainfall (mm)	-0.029		0.095		-0.258	**
Mean annual evapotranspiration (mm)	-0.604	***	-0.019		-0.078	
Topsoil pH	0.629	***	0.308	***	-0.190	*
Log aluminium concentration (mg kg ⁻¹ dry soil)	-0.446	***	-0.139		-0.102	
Log base cation concentration (mg kg ⁻¹ dry soil)	-0.351	***	0.474	***	-0.381	***
Log C (%)	-0.458	***	0.151		0.151	
Log N (%)	-0.203	*	-0.114		-0.113	
C:N	-0.301		-0.447	***	0.166	*
KCl extractable nitrate concentration (mg kg ⁻¹ dry soil)	-0.368	***	0.397	***	0.179	*
KCl extractable ammonium concentration (mg kg ⁻¹ dry soil)	-0.196	*	-0.129		-0.011	
Olsen extractable P concentration (mg kg ⁻¹ dry soil)	0.013		0.073		0.122	
Management type (grazing or mowing)	0.551	***	-0.196	*	-0.018	
Total inorganic N deposition (kg N ha ⁻¹ yr ⁻¹)	-0.301	***	-0.293	***	0.464	***
Total inorganic S deposition (kg S ha ⁻¹ yr ⁻¹)	-0.355	***	-0.104	***	0.006	

After excluding highly inter-correlated variables we used 11 variables (Table 1) in the CCA. These variables explained 24% of the total variation in the species composition. Variance partitioning of the explained variation showed that soil variables (topsoil pH, log aluminium concentration, log C content, log N content, C:N ratio) were the group that explained the most variation in the data set, accounting for 38.0% of the constrained total inertia. Climate and geographic variables (latitude, longitude and mean daily maximum temperature) accounted for 30.8% of the variation in the constrained total inertia. A further 13.3% of the variation was accounted for by a combination of these variables. Deposition variables (N and S deposition) alone explained 9.8% of the variation in the constrained total inertia, with a further 6.2% overlap in explanatory power between deposition and soil variables. The remaining 1.9% of the variation was explained by overlap between the three variable groups (Fig. 3).

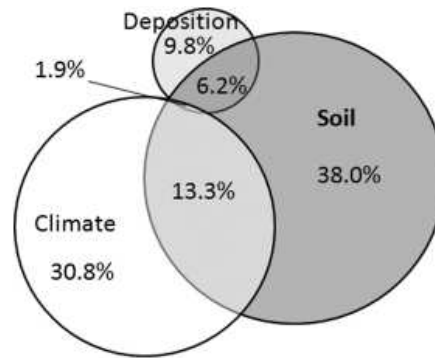


Fig. 3. Amount of variation in species composition described by CCA analysis which is explained by three groups of explanatory variables: deposition (N deposition and S deposition), soil (topsoil pH, aluminium concentration, base cation concentration, C content, N content and C:N ratio) and climate and geographic location (latitude, longitude and mean daily maximum temperature). Areas of circles in the Venn diagram show approximately the percent of variation explained relative to the total variation explained by the full CCA model (24%).

CCA was also used to identify species positively and negatively associated with N deposition. For this constrained ordination, N and S deposition were used as environmental variables and all other variables were used as co-variables. Fig. 4 shows only those species which occurred in more than 10% of sites.

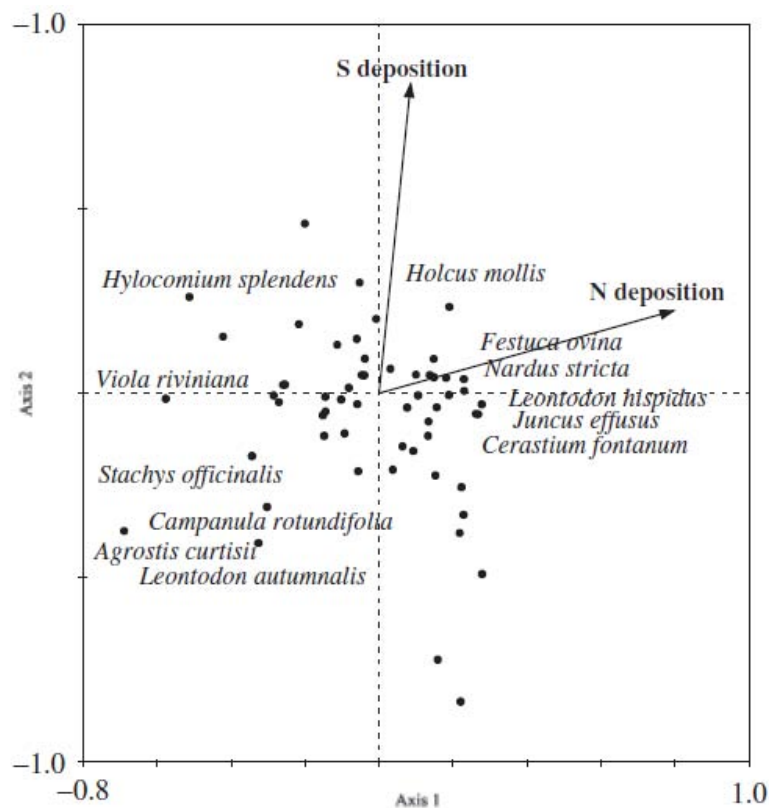


Fig. 4. CCA ordination diagram (axes 1 and 2) for all species with N and S deposition as environmental variables and climate and soil variables used as co-variables. Rare species are down-weighted. Species plotted occurred in more than 10% of sites and species positively or negatively associated with N deposition (assessed by their positions in the ordination diagram) are named.

Species most strongly positively associated with N deposition in the ordination diagram were *Holcus mollis* L., *Leontodon hispidus* L., *Festuca ovina sensu lato* L., *Nardus stricta* L., *Cerastium fontanum* Baumg. and *Juncus effusus* L. Species that were rarer within the dataset but showed a particularly strong association with high N deposition were *Senecio jacobaea* L. and *Cynosurus cristatus* L.. Species most strongly negatively associated with N deposition were *Agrostis curtisii* Kerguelen, *Viola riviniana* Reichenb., *Leontodon autumnalis* L., *Campanula rotundifolia* L. and *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. Eur. Species that were rarer within the dataset but showed a particularly strong association with low N deposition were *Vaccinium vitis-idaea* L. and *Hypericum pulchrum* L.

Discussion

Climate and geographic variables explain almost a third of species composition variation in our study. Further influence of climate may have been missed as we did not consider the hydrology and water-holding capacity of each soil at each site. Given the large spatial gradient over which this study has been conducted, the importance of climate in influencing species composition is also of no surprise. The variability in climatic factors across the gradient is large, with mean daily minimum temperatures ranging from -0.6 °C to 10.2 °C and mean daily maximum temperatures ranging from 6.8 °C to 18.8 °C. Rainfall also varies considerably across the gradient, from 498 mm y⁻¹ to 1971 mm y⁻¹.

Atmospheric deposition alone explains 9.8% of the variation in species composition in our data set. As shown in Fig. 3, there is a strong influence of soil on the species composition found along the gradient of atmospheric deposition used in this study. We need to consider, however, that N and S deposition have the potential to acidify soils, which presents problems in disentangling their impacts on the vegetation community. Soil acidification and consequent mobilization of metals and reduction in base cation availability have been observed in this grassland community and related to N deposition (Stevens et al. 2009a, 2010b) and changes in soil C:N have also been related to N deposition (Stevens et al. in press). As the proportion of variation that is jointly explained by deposition and soil is small, it is likely that the influence of deposition on soil is not fully accounted for in the overlap found here. This may be partly due to the large variability in the soil textures and types encountered in this survey, leading to differences in how the deposited N is processed in the soil. As a consequence of the influence of N and S deposition on soil chemistry, the variation explained by deposition and the variation explained by soil cannot be considered entirely independent. N and S deposition were considered together in our analysis since they are highly correlated ($r=0.45$) in our data set which presents problems in disentangling their degree of influence on the community composition.

These results for species composition found in this study contrast with results obtained for species richness (Stevens et al. 2010a). For species richness, geographic and physical variables (location, climate and site characteristics) explained very little of the variation (<

1%) whereas here climate and geographical variables explain almost one-third of the variation. Species richness was reduced by atmospheric deposition, most likely due to the loss of rare species in the different regions. As a result, in this study the compositional shift is not as evident given that the more dominant species remain the same. The vast majority of the species found in this survey occurred across the whole of the spatial extent of the survey, but there were some notable exceptions, such as *Agrostis curtisii*, which replaces *A. capillaris* as the dominant grass in some sites in the west of France and the southwest of England. The restricted distribution of *A. curtisii* is thought to be related to climatic and edaphic factors (Ivimey-Cook 1959). There were a number of other species which, although not showing strongly restricted distribution in our study area, were only found in this community in some geographical areas or were at a much higher abundance in some areas (e.g. *Arnica montana* L.).

Species that were most strongly associated with low N deposition tend to be forbs that are poor competitors and are not tolerant of highly acidic soils. *Viola riviniana* is described in Grime et al. (2007) as intermediate between stress-tolerator and C-S-R strategist but, perhaps more importantly, it is rarely found in the most acid soils. This may also be true of *Campanula rotundifolia*, also intermediate between stress-tolerator and C-S-R but again, rarely found on strongly acid soils (Grime et al. 2007). *C. rotundifolia* is also a poor competitor with vigorous grasses (Sinker et al. 1991) so may not be competing well with grass species that are encouraged by high N deposition. *Leontodon autumnalis* is a species typical of intermediate fertility but is also found commonly on weakly acid soils rather than highly acid soils (Ellenberg et al. 1991; Hill et al. 1999). The moss *Hylocomium splendens* has been shown to decrease with N additions in several forest experiments. Doses of 30 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ caused a strong decline of *H. splendens* abundance in Sweden (Dirkse & Martakis 1992) and a decline was also identified in coniferous forests in southern Germany over a 20-40 year period. The latter was attributed to sensitivity to acidification (Rodenkirchen 1992). Duprè et al. (2010) also identified a decline in *H. splendens* in the UK from the analysis of historic quadrat data collected between 1960-75 and 1975-2003. The limited distribution of *Agrostis curtisii* means that the strong association with low N deposition for this species should be interpreted with some caution; however, it is a species very typical of infertile habitats (Ellenberg N score of 1 in Hill et al. 1999).

Species most strongly associated with high N deposition were *Holcus mollis*, *Festuca ovina*, *Nardus stricta*, *Cerastium fontanum*, *Leontodon hispidus* and *Juncus effusus*. None of these species are typical of fertile habitats, but given that the vegetation community in which we were working is characterized by extremely poor soils, this is what would be expected. Both *H. mollis* and *J. effusus* tend towards being competitive species and they are both tolerant of very acid soils, while *C. fontanum* is a more ruderal species (Grime et al. 2007). An increase in graminoid species is often associated with increased N deposition (Stevens et al. 2009b; Duprè et al. 2010) and *H. mollis* increased in relative frequency in Germany and

the UK between 1939-1975 and 1975-2007. The association of *L. hispidus* with high deposition is more surprising as this species is not typical of highly acidic or nutrient rich habitats (Ellenberg et al. 1991; Hill et al. 1999) and requires further investigation.

It is clear from this analysis that N deposition has the potential to influence vegetation community composition in acid grasslands, both directly and indirectly by soil-mediated effects. Although secondary to climate gradients and soil biogeochemistry, the impact of N and S deposition on species composition can be detected, even at a large spatial scale. These results have important implications for conservation management and suggest that in order to maintain acid grasslands in good condition we need to reduce N deposition or manage grasslands in a way that mitigates its effects.

Acknowledgements

This project was funded by the European Science Foundation through the EURODIVERSITY-programme, and national funds were provided by DFG (Germany), NERC (United Kingdom), NWO (The Netherlands) and INRA, ADEME and Aquitaine Region (France). Some of the data analysis presented here was funded by The Open University Department of Life Sciences. We are grateful to everyone who assisted with field and laboratory work, and conservation agencies and land owners who gave permission for sampling. MMU hosted CS as a visiting research fellow for part of this project.

References

- Arroniz-Crespo, M., Leake, J. R., Horton, P., & Phoenix, G. K. 2008. Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilisation in acidic grassland. *New Phytologist*, 180: 864-874.
- Asman, W. A. H., & van Jaarsveld, J. A. 2002. A variable-resolution transport model applied for NH_x in Europe. *Atmospheric Environment*, 26A: 445-464.
- Bennie, J., Hill, M. O., Baxter, R., & Huntley, B. 2006. Influence of slope and aspect on long-term vegetation change in British chalk grasslands. *Journal of Ecology*, 94: 355-368.
- Bobbink, R., Hornung, M., & Roelofs, J. G. M. 1998. The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology*, 86: 717-738.
- Borcard, D., Legendre, P., & Drapeau, P. 1992. Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology*, 73: 1045-1055.
- Brunsting, A. M. H., & Heil, G. W. 1985. The role of nutrients in the interactions between a herbivorous beetle and some competing plant species in heathlands. *Oikos*, 44: 23-26.
- Caporn, S. J. M., Ashenden, T. W., & Lee, J. A. 2000. The effect of exposure to NO₂ and SO₂ on frost hardiness in *Calluna vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 111-119.

- Carroll, J. A., Caporn, S. J. M., Johnson, D., Morecroft, M. D., & Lee, J. A. 2003. The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, 121: 363-376.
- Clark, C. M., & Tilman, D. 2008. Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, 451: 712-715.
- Dirkse, G. M., & Martakis, G. F. P. 1992. Effects of fertilizer on bryophytes in Swedish experiments on forest fertilization. *Biological Conservation*, 59: 155-161.
- Duprè, C., Stevens, C. J., Ranke, T., Bleeker, A., Pepller-Lisbach, C., Gowing, D. J. G., Dise, N. B., Dorland, E., Bobbink, R., & Diekmann, M. 2010. Changes in species richness and composition in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology*, 16: 344-357.
- Ellenberg, H., Weber, H. E., Dull, R., Wirth, V., Werner, W., & Paulissen, D. 1991. Zeigerwerte von pflanzen in Mitteleuropa. *Scripta Geobotanica*, 18: 1-248.
- EMEP. 1999. *Transboundary acid deposition in Europe. EMEP emission data. Status report 1999 of the European Monitoring and Evaluation Programme.*, EMEP/MS-C-W
- Fagerli, H., & Aas, W. 2008. Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution*, 154: 448-461.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., & Sutton, M. A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science*, 320: 889-892.
- Gauger, T., Anshelm, F., Schuster, H., Erisman, J. W., Vermeulen, A. T., Draaijers, G. P. J., Bleeker, A., & Nagel, H.-D. 2002. *Mapping of ecosystems specific long-term trends in deposition loads and concentrations of air pollutants in Germany and their comparison with Critical Loads and Critical Levels.* Institut für Navigation, University of Stuttgart, Germany.
- Gidman, E. A., Stevens, C. J., Goodacre, R., Broadhurst, D., Emmett, B., & Gwynn-Jones, D. 2006. Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology* 12: 1823-1833.
- Grime, J. P., Hodgson, J. G., & Hunt, R. 2007. *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species.* Unwin Hyman, London.
- Hautier, Y., Niklaus, P. A., & Hector, A. 2009. Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science*, 324: 636-638.
- Hill, M. O., Mountford, J. O., Roy, D. B., & Bunce, R. G. H. 1999. *Ellenberg's indicator values for British plants. ECOFACT Volume 2. Technical Annex.*, Institute of Terrestrial Ecology.
- Ivimey-Cook, R. B. 1959. Biological flora of the British Isles: *Agrostis setacea*. *Journal of Ecology*, 47: 691-706.
- Kleinebecker, T., Holzel, N., & Vogel, A. 2008. South Patagonian ombrotrophic bog vegetation reflects biogeochemical gradients at the landscape level. *Journal of Vegetation Science*, 19: 151-160.

- MAFF. 1986. *The analysis of Agricultural Materials*. Her Majesty's Stationary Office, London.
- MARS. (2009). "European Commission Joint Research Centre". City.
- Maskell, L. C., Smart, S. M., Bullock, J. M., Thompson, K., & Stevens, C. J. 2010. Nitrogen Deposition causes widespread species loss in British Habitats. *Global Change Biology*, 16: 671-679.
- Mountford, J. O., Lakhani, K. H., & Kirkham, F. W. 1993. Experimental assessment of the effects of nitrogen addition under hay-cutting and aftermath grazing on the vegetation of meadows on a Somerset peat moor. *Journal of Applied Ecology*, 30: 321-332.
- Mountford, J. O., Tallowin, J. R. B., Kirkham, F. W., & Lakhani, K. H. "Effects of Inorganic fertilisers in flower-rich hay meadows on the Somerset Levels." *Presented at Grassland management and nature conservation.*, Leeds University 27-29 September 1993.
- Mylona, S. 2002. Sulphur dioxide emissions in Europe 1880–1991 and their effect on sulphur concentrations and depositions. *Tellus*, 48: 662-689.
- NEGTA. 2001. *Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK.*, CEH, Edinburgh.
- Oke, T. R. 1987. *Boundary layer climates*. Methuen, New York.
- Pearson, J., & Stewart, G. R. 1993. Tansley Review No.56. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, 125: 283-305.
- Phoenix, G. K., Hicks, W. K., Cinderby, S., Kuylentierna, J. C. L., Stock, W. D., Dentener, F. J., Giller, K. E., Austin, A. T., Lefroy, R. D., Gimeno, B. S., Ashmore, M. R., & Ineson, P. 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*, 12: 470-476.
- Pieterse, G., Bleeker, A., Vermeulen, A. T., Wu, Y., & Erisman, J. W. 2007. High resolution modelling of atmosphere-canopy exchange of acidifying and eutrophying components and carbon dioxide for European forests. *Tellus*, 59B: 412-424.
- Pitcairn, C. E. R., Leith, I. D., Sheppard, L. J., Sutton, M. A., Fowler, D., Munro, R. C., Tang, S., & Wilson, D. 1998. The relationship between nitrogen deposition, species composition and foliar nitrogen concentrations in woodland flora in the vicinity of livestock farms. *Environmental Pollution*, 102: 41-48.
- Rich, T., Redbane, M., Fasham, M., McMeechan, F., & Dobson, D. 2005. "Ground and shrub vegetation". In D. Hill, M. Fasham, G. Tucker, M. Shewry, and P. Shaw, (eds.), *Handbook of biodiversity methods: survey, evaluation and monitoring* pp. 201-222 Cambridge University press, Cambridge.
- Rodenkirchen, H. 1992. Effects of acidic precipitation, fertilization and liming on the ground vegetation in coniferous forests of Southern Sweden. *Water, Air and Soil Pollution*, 61: 279-294.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M., &

- Wall, D. H. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774.
- Schuster, B., & Diekmann, M. 2003. Changes in species density along the soil pH gradient - Evidence from German plant communities. *Folia Geobotanica*, 38: 367-379.
- Schwickerath, M. 1944. Das Hohe Venn und seine Randgebiete. *Pflanzensoziologie*, 6: 1-278.
- Sheppard, L. J., & Leith, I. D. 2002. Effects of NH₃ fumigation on the frost hardiness of *Calluna* - Does N deposition increase winter damage by frost? *Phyton-annales rei botanicae*, 42: 183-190.
- Sinker, C. A., Packham, J. R., Trueman, I. C., Oswald, P. H., Perring, F. H., & Prestwood, W. V. 1991. *Ecological Flora of the Shropshire Region*. Shropshire Wildlife Trust, Shrewsbury.
- Smart, S. M., Robertson, J. C., Shiels, E. J., & Van de Poll, H. M. 2003. Locating eutrophication effects across British vegetation between 1990 and 1998. *Global Change Biology*, 9: 1763-1774.
- Smith, R. I., Fowler, D., Sutton, M. A., Flechard, C., & Coyle, M. 2000. Regional estimation of pollutant gas dry deposition in the UK: model description, sensitivity analyses and outputs. *Atmospheric Environment*, 34: 3757-3777.
- Stevens, C. J., Dise, N. B., Mountford, J. O., & Gowing, D. J. 2004. Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science*, 303: 1876-1879.
- Stevens, C. J., Dise, N. B., Gowing, D. J., & Mountford, J. O. 2006. Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology*, 12: 1823-1833.
- Stevens, C. J., Dise, N. B., & Gowing, D. J. 2009a. Regional trends in soil acidification and metal mobilisation related to acid deposition. *Environmental Pollution*, 157: 313-319.
- Stevens, C. J., Maskell, L. C., Smart, S. M., Caporn, S. J. M., Dise, N. B., & Gowing, D. J. 2009b. Identifying indicators of atmospheric nitrogen deposition impacts in acid grasslands. *Biological Conservation*, 142: 2069-2075.
- Stevens, C. J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D. J. G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J. O., Vandvik, V., Aarrestad, P. A., Muller, S., & Dise, N. B. 2010a. Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution*, 158: 2940-2945.
- Stevens, C. J., Thompson, K., Grime, J. P., Long, C. J., & Gowing, D. J. G. 2010b. Contribution of acidification and eutrophication to declines in species richness of calcifuge grasslands along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Functional Ecology*, 24: 478-484.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S. & Dise, N.B. In press. The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution* doi:10.1016/j.envpol.2010.11.026.

- Thomas, G. W. 1996. "Soil pH and Soil Acidity". In D. L. Sparks, (ed.), *Chemical Methods*. pp. 475-490 Soil Science Society of America, Wisconsin.
- Tyler, G. 2003. Some ecophysiological and historical approaches to species richness and calcicole/calcifuge behaviour - Contribution to a debate. *Folia Geobotanica*, 38: 419-428.
- Van Jaarsveld, J. A. 1995. *Modelling the long-term atmospheric behaviour of pollutants on various spatial scales*. University of Utrecht, The Netherlands.
- Van Jaarsveld, J. A. 2004. *The operation priority substances model*. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- Wedin, D., & Tilman, D. 1993. Competition among grasses along a nitrogen gradient: Initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs*, 63: 199-219.
- Wilson, E. J., Wells, T. C. E., & Sparks, T. H. 1995. Are calcareous grasslands in the UK under threat from nitrogen deposition? - an experimental determination of a critical load. *Journal of Ecology*, 83: 823-832.

-ANNEXE 3-

Article 3 The impact of nitrogen deposition on acid
grasslands in the Atlantic region of Europe

Carly J. Stevens, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, David
J.G. Gowing, Albert Bleeker, Martin Diekmann, Didier Alard, Roland
Bobbink, David Fowler, Emmanuel Corcket, J. Owen Mountford, Vigdis
Vandvik, Per Arild Aarrestad, Serge Muller, Nancy B. Dise.

Environmental Pollution (2011) 159, 2243-2250

The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe

Carly J. Stevens^{a,b,*}, Cecilia Duprè^c, Edu Dorland^{d,e}, Cassandre Gaudnik^f, David J.G. Gowing^a, Albert Bleeker^g, Martin Diekmann^c, Didier Alard^f, Roland Bobbink^h, David Fowlerⁱ, Emmanuel Corcket^f, J. Owen Mountford^j, Vigdis Vandvik^k, Per Arild Aarrestad^l, Serge Muller^m, Nancy B. Diseⁿ.

^aDepartment of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

^bLancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK.

^cInstitute of Ecology, FB 2, University of Bremen, Leobener Str., DE-28359 Bremen, Germany.

^dEcology & Biodiversity Group, Department of Biology, Institute of Environmental Biology, Utrecht University, PO Box 80.058, 3508 TB Utrecht, The Netherlands.

^eCurrent address: Staatsbosbeheer, PO Box 1300, 3970 BH Driebergen, The Netherlands.

^fUniversity of Bordeaux 1. UMR INRA 1202 Biodiversity, Genes and Communities, Equipe Ecologie des Communautés, Bâtiment B8 - Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France.

^gDepartment of Air Quality & Climate Change, Energy Research Centre of the Netherlands, PO Box 1, 1755, ZG Petten, The Netherlands.

^hB-WARE Research Centre, Radboud University, PO Box 9010, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands.

ⁱNERC Centre for Ecology and Hydrology, Bush Estate, Penicuik, Midlothian, EH26 0QB, UK.

^jNERC Centre for Ecology & Hydrology, MacLean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford, Wallingford, Oxfordshire, OX10 8BB, UK.

^kDepartment of Biology, University of Bergen, Box 7800, N-5020 Bergen, Norway.

^lNorwegian Institute for Nature Research, PBox 5685 Sluppen, NO-7485 Trondheim, Norway.

^mLaboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes (LIEBE), UMR CNRS 7146, U.F.R. Sci. F.A., Campus Bridoux, Université Paul Verlaine, Avenue du Général Delestraint F 57070 Metz, France..

ⁿDepartment of Environmental and Geographical Science, Manchester Metropolitan University, Manchester M1 5GD, UK.

*Corresponding author:

Dr. Carly J. Stevens

Department of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

Tel: +44 1524 593937

Fax: +1524 593985

Abstract

A survey of 153 acid grasslands from the Atlantic biogeographic region of Europe indicates that chronic nitrogen deposition is changing plant species composition and soil and plant tissue chemistry. Across the deposition gradient (2 to 44 kg N ha⁻¹ yr⁻¹) grass richness as a proportion of total species richness increased whereas forb richness decreased. Soil C:N ratio increased, but soil extractable nitrate and ammonium concentrations did not show any relationship with nitrogen deposition. The above-ground tissue nitrogen contents of three plant species were examined: *Agrostis capillaris* (grass), *Galium saxatile* (forb) and *Rhytidiadelphus squarrosus* (bryophyte). The tissue nitrogen content of neither vascular plant species showed any relationship with nitrogen deposition, but there was a weak positive relationship between *R. squarrosus* nitrogen content and nitrogen deposition. None of the species showed strong relationships between above-ground tissue N:P or C:N and nitrogen deposition, indicating that they are not good indicators of deposition rate.

Keywords: Atmospheric nitrogen deposition, plant functional group, plant tissue nitrogen, soil C:N, soil pH.

Introduction

Atmospheric nitrogen (N) deposition is a global environmental problem. Nitrogen oxides are predominantly emitted from the burning of fossil fuels. Between 1980 and 2003 most of Europe (excluding Portugal, Spain and Greece) saw a reduction in oxidised N emissions of between 20 and 50 %. This downward trend is generally reflected in wet deposition (in rainfall) but not in dry deposition (as a gas or fine particulate) (Fagerli & Aas 2008). For ammonia emissions and deposition the pattern is much more mixed, with some European countries showing small decreases and others increases. 90 % of ammonia emissions are from agricultural sources (Erisman et al. 2008) and consequently can vary greatly within a small area. Nevertheless, total deposition of N remains high in many parts of Europe and critical loads (thresholds above which there is risk of damage to sensitive components of the ecosystem) are already exceeded in many countries (Galloway et al. 2008), representing a threat to biodiversity and ecosystem services (Mace et al. 2005). Indeed, N deposition is forecast to be, together with land use and climate change, in the top three drivers of change in global biodiversity by the year 2100 (Sala et al. 2000).

N deposition has a number of different potential impacts on semi-natural ecosystems. At high air concentrations NH₃ and NH₄⁺ are phytotoxic, causing leaf damage and growth reduction (e.g. Pearson & Stewart, 1993; Sheppard 2002). Concentrations of ammonia high enough to cause direct toxicity are quite rare in Europe and generally only occur in the immediate vicinity of point sources. However, at lower levels, the effects of N deposition on vegetation can still be observed, including soil-mediated effects of eutrophication and acidification, and increased susceptibility to secondary stress (Bobbink et al. 2010).

In many semi-natural terrestrial ecosystems N is the limiting nutrient, so the addition of N has the potential to increase primary productivity. This can lead to increased plant competition for other resources, such as light and phosphorus, shifting the plant community towards one dominated by more competitive species (e.g. Bobbink et al. 1998; Clark et al. 2007; Hautier et al. 2009). Grasses are generally considered to be the more productive component of grasslands and are frequently thought to increase in response to eutrophication, shading out stress-tolerant components of the sward (e.g. Hautier et al. 2009). This results in changes in species composition and the balance of functional groups. The increase in plant litter from the enhanced productivity of vegetation can increase N turnover. More decomposable species are often favoured and tissue quality increases leading to an increase in N mineralisation rates (Aerts & Chapin 2000). Other effects of N deposition include an increased susceptibility to insect herbivory, such as the increased frequency and intensity of attacks on *Calluna vulgaris* from the heather beetle (*Lochmaea suturalis*) (e.g. Brunsting & Heil 1985). Increased attacks from insect herbivores are thought to be related to elevated concentrations of N in plant tissues and decreased concentrations of carbon (C) -based defensive compounds (Throop & Lerdau 2004). Indeed, many studies have reported changes in plant-tissue chemistry related to N deposition (e.g. Pitcairn et al. 1998; Gidman et al. 2006). N deposition also leads to an increased incidence of drought and frost stress (e.g. Carroll et al. 1999,) which, due to species differences in susceptibility, can alter plant species composition.

Deposition of acids in precipitation, oxidation of dry-deposited compounds, loss of basic cations through ion exchange, plant uptake, and nitrification of ammonium, result in a reduction of soil pH either directly or indirectly related to N deposition (Bobbink et al. 2010). Increased soil acidity can have a number of potential consequences including increased solubility of potentially toxic metals, changes to nutrient cycling, reducing or changing the populations of soil microbes and fauna, and changing plant species composition and richness (Johnston et al. 1986; Falkengren-Grerup 1995; Stevens et al. 2004; 2009). The potential for N deposition to impact plant species composition, soil chemistry and plant-tissue chemistry has been clearly demonstrated in numerous N addition experiments in a range of habitats (e.g. Phoenix et al. 2003; Pilkington et al. 2005; Berger et al. 2009). However, there have been far fewer investigations on whether these changes are actually occurring at a regional scale. There have been several studies in Great Britain demonstrating changes in plant species richness and composition (e.g. Stevens et al. 2004; Maskell et al. 2010) and soil chemistry (e.g. Stevens et al. 2006; 2009) across a N deposition gradient but, until now, none that investigate correlations between N deposition and soil chemistry and plant tissue chemistry in acid grasslands at a European scale.

Here we report data from a study that gathered data on species composition, soil chemistry and plant-tissue chemistry from 153 acid grasslands in 13 different countries within the Atlantic biogeographic zone of Europe. This was used to test the hypotheses that 1) the

proportion of species richness accounted for by forbs will decrease whilst the proportion of species richness accounted for by grasses will increase; 2) Al:Ca ratio and soil N (available nitrate, ammonium and total N) will increase and C:N ratio will decrease with increasing N deposition and 3) the N concentration of plant tissues will increase with increasing N deposition. Richness of functional groups as a proportion of total species richness was used to assess relative changes in composition and to determine whether the proportion of richness made up by the functional groups is changing rather than changes observed being a function of changing richness. The results of this study will demonstrate impacts of ambient levels of N deposition over a large-scale spatial gradient providing evidence for European policy and, in particular, the development of critical loads for N.

Methods

153 acid grasslands belonging to the *Violion caninae* association (Schwickerath, 1944) were surveyed within the Atlantic biogeographic zone of Europe (Fig. 1). This community is typically dominated by grasses including *Agrostis capillaris* and *Festuca ovina* or *rubra* with forbs such as *Galium saxatile* and *Potentilla erecta* and bryophytes including *Rhytidiadelphus squarrosus* occurring at a high constancy. Soils are variable in texture and of acidic pH (approximately pH 3.5 to 6). This community is found throughout the Atlantic biogeographic region of Europe. The grasslands were selected to cover the range of atmospheric N deposition in Europe (N deposition at sites ranged from 2 to 44 kg N ha⁻¹ yr⁻¹). None of the grasslands surveyed were fertilised and all were managed by grazing or cutting. Areas within the grassland that belonged to other plant communities or were strongly affected by animals, tracks and paths, or were in the rain shadows of trees or hedges were excluded from the survey. Surveys were conducted between May and September in 2002/3 and 2007. At each site, five randomly located 2 × 2 m quadrats were surveyed within a 1 ha area. Within each quadrat all vascular plants and bryophytes were identified to a species level. A description of the site was made including latitude, longitude, aspect, slope, patch size of the habitat from which the sample was taken, soil depth, management intensity (estimated based on vegetation height and number of grazing animals on a scale of one to three from intensive to extensive) and dominant species in adjacent vegetation communities.

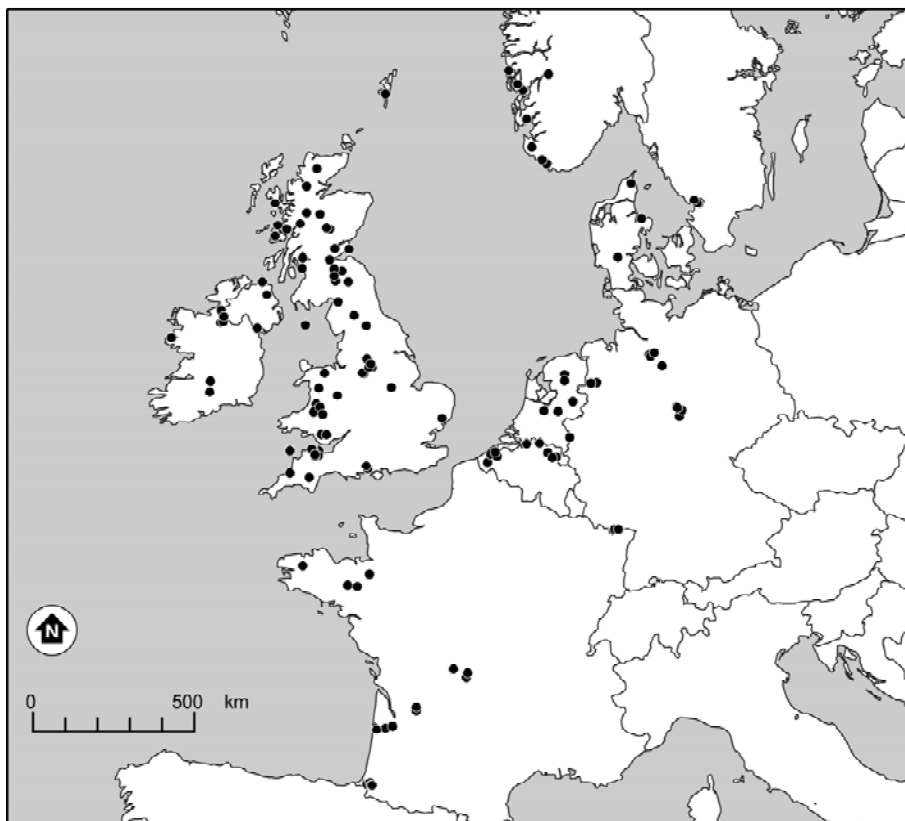


Fig. 1. Map of the 153 acid grasslands surveyed in the Atlantic biogeographic zone of Europe.

Soil samples were collected from each quadrat. Topsoil samples were taken at a depth of 0-10 cm below the litter layer. Samples were taken from two opposing corners of the quadrat using a trowel and bulked to give one sample per quadrat. Subsoil samples were taken at a depth of 20-30 cm deep or, where soils were shallower than 20 cm, as deep as possible. Subsoil samples were taken from the centre of the quadrat using a 5 cm diameter soil auger. All soil samples were bagged and kept cool during transit.

Plant tissue samples were collected from within the vicinity of the quadrats. Approximately two grams (dry weight) of above-ground material were collected for three species: *Agrostis capillaris* L. (bent grass), *Galium saxatile* L. (lady's bedstraw) and the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst at all sites where the species occurred. These species were selected as they are both common and abundant throughout the geographical area investigated in this project. Only living material was collected. Samples were washed in deionised water.

In the laboratory, soil samples were air dried, roots and stones removed and remaining soil ground to <2 mm prior to analysis using a pestle and mortar. For total C and N analysis, soils were ground to a fine powder. Plant samples were oven dried for three days at 55 °C and then ground to < 2 mm.

Nitrate, ammonium, dissolved calcium (Ca) and aluminium (Al) concentrations were analysed using two different methods. Samples collected in 2002 and 2003 were leached with 1M KCl and the resulting nitrate and ammonium analysed using an ion chromatograph. Other samples were shaken with 0.4M NaCl and analysed using an auto-analyser. For all samples metal concentrations were determined using an ICP-MS. A comparison between the two methodologies was made to ensure they were compatible. Total C and N content of the soil and plant material was analysed using a CN element analyser. Plant tissue phosphorus (P) concentration was determined using a dry ashing extraction method (Chapman & Pratt 1961; Ryan et al. 2001) followed by a Barton colour complex (MAFF 1986). Absorbance was determined using a colorimeter at a wavelength of 410 nm. Soil pH was determined using a pH probe in a 1:5 slurry of soil and deionised water.

Meteorological data for all the sites were obtained from the European Space Agency Monitoring Agriculture with Remote Sensing (MARS) unit (MARS 2009). Ten year averages (1996-2006) were calculated for each site for mean annual potential transpiration, mean minimum daily temperature, mean maximum daily temperature and mean annual rainfall. Radiation index (based on latitude, aspect and slope) was calculated according to Oke (1987). The European gradient gives a greater range of N deposition compared to the UK alone but also covers a broader range of climatic conditions including sites that were wetter, drier, warmer and cooler than found in the UK alone.

For each site, total N, reduced N, oxidised N and sulphur (S) deposition data were modelled using the best available deposition model. National models were used for Germany (Gauger et al. 2002,) the Netherlands (van Jaarsveld 2004; Asman & van Jaarsveld 1992; van Jaarsveld 1995) and the United Kingdom (NEG-TAP 2001; Smith et al. 2000). For all other countries, the EMEP-based IDEM model (Pieterse et al. 2007) was used. For all of the models, deposition was calculated as a 3-year average (2000–2003) to provide a robust estimate of longer-term N inputs. Acid deposition was calculated from the molar equivalents of reactive N and S ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{2-}$, $\text{mmol}_c \text{m}^{-2} \text{y}^{-1}$).

Linear regression and linear mixed-effects models were conducted using R (R Core Development Team 2007; package nlme). All variables were checked for normality and corrected if necessary and strongly inter-correlated independent variables ($r > 0.6$) were removed from the models. Linear mixed-effects models (dependent variables topsoil pH, Al, nitrate and ammonium concentrations, total soil C, total soil N, soil C:N and plant tissue N concentration for *Agrostis capillaris*, *Galium saxatile* and *Rhynchospora alba*) used the following predictors: latitude, longitude, altitude, aspect, inclination, mean maximum daily temperature, mean minimum daily temperature, mean annual rainfall, radiation index, vegetation height, management intensity, total N deposition and S deposition, and country as a random variable. For plant tissue variables soil topsoil pH, Al, nitrate and ammonium concentrations, total C, total N, C:N were included as predictors. Minimum adequate models

were selected manually by deleting variables until only significant variables remained. For plant composition data, the five replicate quadrats at each site were added together to give a list of species per site. Within functional group richness for grasses, forbs and bryophytes was calculated as a proportion of total species richness. Species richness for each functional group is presented in Stevens et al. 2010.

Results

Nitrogen Deposition

Total inorganic N deposition ranged from 2 to 44 kg N ha⁻¹ yr⁻¹. Oxidised N deposition ranged from 1.2 to 18.3 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ and reduced deposition ranged from 1.2 to 28.7. Oxidised and reduced deposition were highly correlated with total N deposition (oxidised: $r=0.85$; reduced: $r=0.96$) and each other ($r=0.69$).

Functional group composition

Results for total species richness are presented in Stevens et al. (2010). Species richness of grasses (mean of five 2 m x 2 m quadrats) ranged from 2.2 to 8.4 species. Grass richness as a proportion of total species richness shows a significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.21$, $p<0.001$) (Fig. 2a). Breaking this down into reduced and oxidised N shows that both have very similar relationships with grass richness (reduced N: $r^2=0.18$, $p<0.001$, oxidised N: $r^2=0.16$, $p<0.001$). Species richness of forbs (mean of five 2 m x 2 m quadrats) ranged from 0.2 to 14.4 species. Forb richness as a proportion of total species richness shows a significant negative relationship with N deposition ($r^2=0.13$, $p<0.001$) (Fig. 2b). As with grass richness, both reduced and oxidised N have very similar negative relationships with forb richness (reduced N: $r^2=0.12$, $p<0.001$, oxidised N: $r^2=0.10$, $p<0.001$). Species richness of bryophytes (mean of five 2 m x 2 m quadrats) ranged from 0 to 8 species. Bryophyte richness as a proportion of total species richness shows a weak but significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.06$, $p<0.001$) (Fig. 2c). Reduced and oxidised N also show similar positive results when analysed against the proportion of bryophytes (reduced N: $r^2=0.06$, $p<0.01$, oxidised: N $r^2=0.02$, $p<0.05$).

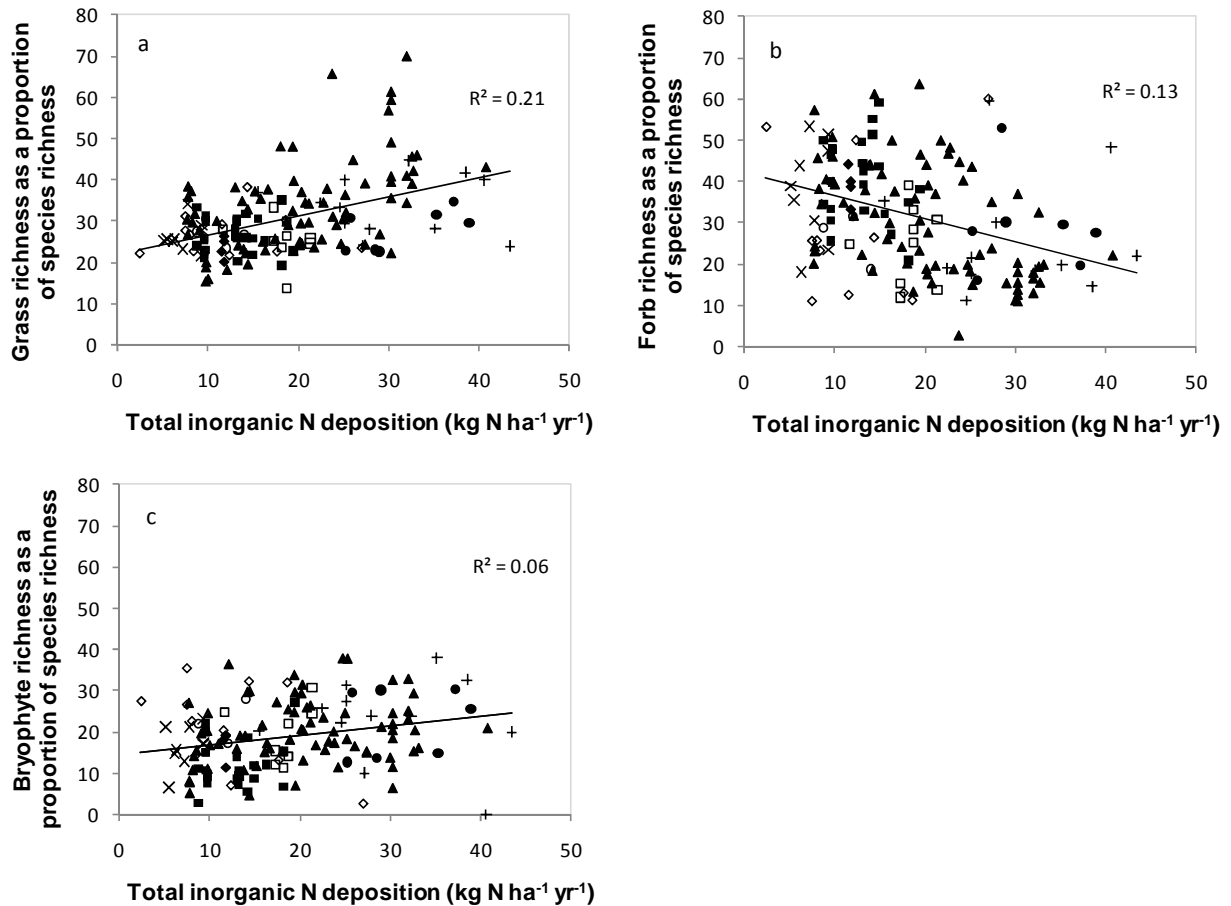


Fig. 2. Within functional group richness as a proportion of species richness for a) grasses, b) forbs and c) bryophytes against total inorganic N deposition for 153 acid grasslands in the Atlantic biogeographic regions of Europe. Symbols show the country from which data were collected: \square Belgium, \circ Denmark, \blacksquare France, $+$ Germany, \diamond Ireland and Isle of Man, \bullet Netherlands, \times Norway, \blacklozenge Sweden, and \blacktriangle United Kingdom.

Soil chemistry

Both topsoil and subsoil pH show a significant negative relationship with total inorganic N deposition (topsoil: $r^2=0.20$, $p<0.001$, subsoil N: $r^2=0.20$, $p<0.001$). Both topsoil and subsoil pH show stronger negative relationships with oxidised N deposition than reduced N deposition (Topsoil: reduced N: $r^2=0.14$, $p<0.001$, oxidised N: $r^2=0.25$, $p<0.001$; subsoil: reduced N: $r^2=0.13$, $p<0.001$, oxidised: N $r^2=0.24$, $p<0.001$). However, the close correlation between oxidised and reduced deposition mean that this should be interpreted with care. When total acid deposition is used instead of total inorganic N deposition, the relationship is slightly improved (topsoil: $r^2=0.25$, $p<0.001$, subsoil: $r^2=0.22$, $p<0.001$). The minimum adequate linear mixed-effects model for topsoil pH showed significant effects of N deposition (parameter value -0.149 , $p<0.01$), latitude (parameter value 0.412 , $p<0.001$) and inclination (parameter value -0.006 , $p<0.01$).

Aluminium concentration (ln transformed for normality) in the topsoil is negatively correlated with topsoil pH ($r^2=0.35$, $p<0.001$). There is a weak but significant positive relationship between aluminium concentration and N deposition ($r^2=0.07$, $p<0.001$). The positive relationship between Al concentration and acid deposition is slightly stronger than with N deposition ($r^2=0.11$, $p<0.001$). The minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of N deposition (parameter value 0.01, $p<0.05$), altitude (parameter value 0.14, $p<0.001$) and rainfall (parameter value 0.0003, $p<0.05$). Aluminium: calcium ratio (Al:Ca) (ln transformed for normality) shows a weak but significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.05$, $p<0.01$). There is no improvement in the relationship by using acid deposition rather than N deposition (data not shown).

Topsoil nitrate concentration (ln transformed for normality) shows no significant relationship with N deposition ($p=0.92$). The minimum adequate linear mixed-effects model showed a significant relationship with latitude (parameter value 0.339, $p<0.001$), altitude (parameter value 0.447, $p<0.05$), inclination (parameter value -0.046, $p<0.01$) and rainfall (parameter value -0.001, $p<0.05$).

Topsoil ammonium concentration (ln transformed for normality) shows a weak but significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.03$, $p<0.05$) but this relationship is mainly driven by a few high points. The minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of N deposition (parameter value 0.043, $p<0.001$), altitude (parameter value 0.287, $p<0.001$) and rainfall (parameter value 0.001, $p<0.05$).

Total N content of the soil shows a weak but significant negative relationship with N deposition ($r^2=0.04$, $p<0.05$) but, again, this relationship is mainly driven by high results from a few sites. This is confirmed by N deposition not being included in the minimum adequate linear mixed-effects model, significant effects were identified for longitude (parameter value -0.023, $p<0.001$), latitude (parameter value 0.035, $p<0.001$) and altitude (parameter value 0.110, $p<0.001$). There is no significant relationship between soil C content and N deposition ($p=0.06$). The minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of longitude (parameter value -0.310, $p<0.001$), latitude (parameter value 0.645, $p<0.001$), altitude (parameter value 1.926, $p<0.001$) and vegetation height (parameter value -0.155, $p<0.05$). However, C:N ratio shows a significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.15$, $p<0.001$) (Fig. 3a). There is a clear significant negative relationship between C:N ratio and pH ($r^2=0.29$, $p<0.001$) (Fig. 3b).

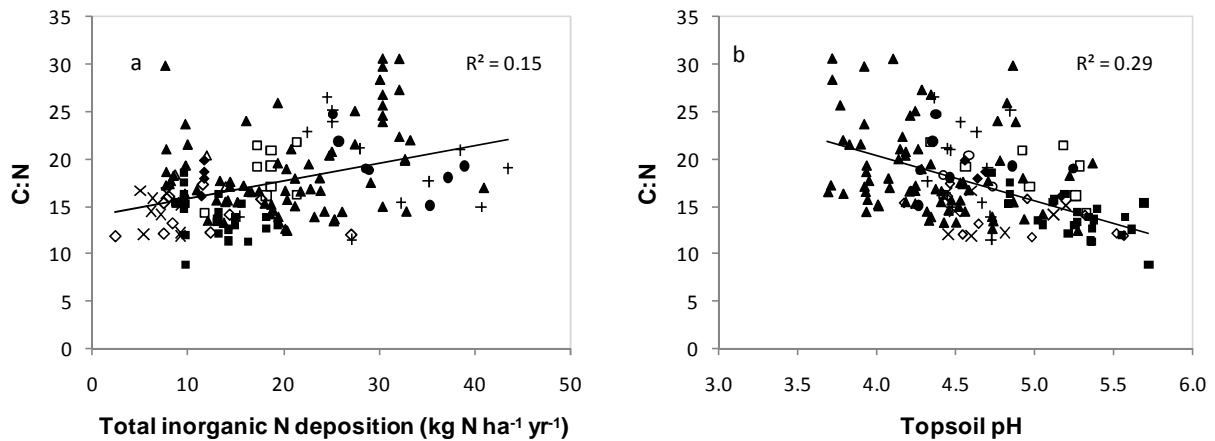


Fig. 3. Topsoil C:N ratio against a) total inorganic N deposition and b) pH for 153 acid grasslands in the Atlantic biogeographic regions of Europe. Symbols for countries are as in fig. 2.

Plant tissue chemistry

A. capillaris was collected from a total of 148 sites. There is no significant relationship between N deposition and *A. capillaris* tissue N content ($p=0.87$) (Fig. 4a), C:N ratio ($p=0.66$) or N:P ratio ($p=0.29$). For tissue N content the minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of latitude (parameter value -0.482 , $p<0.001$), soil pH (parameter value -1.608 , $p<0.05$), S deposition (parameter value 0.172 , $p<0.05$), management intensity (parameter value 1.159 , $p<0.01$) and soil nitrate concentration (parameter value 0.413 , $p<0.01$). *G. saxatile* was collected from 115 sites, being most commonly absent from sites in France. There is no significant relationship between N deposition and *G. saxatile* tissue N content ($p=0.42$) (Fig. 4b) or C:N ratio ($p=0.32$). N:P ratio has a weak but significant positive relationship with N deposition ($r^2=0.04$, $p<0.05$). *R. squarrosus* was collected from a 148 sites. For tissue N content the minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of soil carbon (parameter value -0.167 , $p<0.001$), soil ammonium concentration (parameter value 0.726 , $p<0.001$) and soil nitrate concentration (parameter value 1.267 , $p<0.001$). There is a weak but significant positive relationship between N deposition and *R. squarrosus* tissue N content ($r^2=0.10$, $p<0.001$) (Fig. 4c). There is also a weak but significant negative relationship between N deposition and *R. squarrosus* C:N ($r^2=0.08$, $p<0.001$) but not N:P ($p=0.20$). For tissue N content, the minimum adequate linear mixed-effects model showed significant effects of N deposition (parameter value 0.086 , $p<0.001$), longitude (parameter value 0.167 , $p<0.001$) and management intensity (parameter value 0.584 , $p<0.05$).

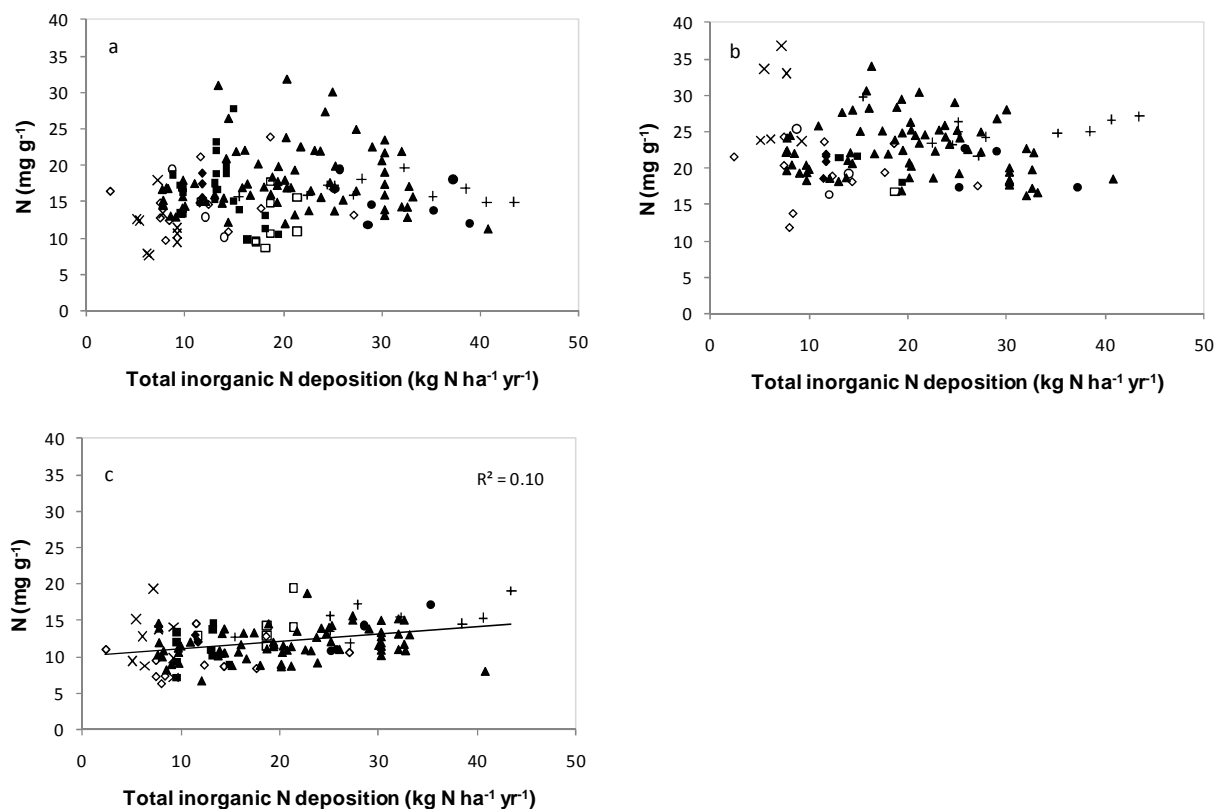


Fig. 4. Aboveground tissue N content for a) *A. capillaris*, b) *G. saxatile* and c) *R. Squarrosus* against total inorganic N deposition for 153 acid grasslands in the Atlantic biogeographic regions of Europe. Symbols for countries are as in figure 2.

Discussion

Functional group composition

There are clear relationships in the plant species composition data that show that the proportion of grass richness in the sward increases with increasing N deposition, whereas the proportion of forb richness decreases steeply. Species richness of forbs showed a significant reduction with increasing N deposition (Stevens et al. 2010). A similar trend was observed in the earlier UK survey (Stevens et al. 2004) and other surveys (e.g. Stevens et al. 2009a; Dupre et al. 2010) as well as in N addition experiments (e.g. Mountford et al. 1993; Wilson et al. 1995). Although N deposition impacts are usually attributed primarily to eutrophication and the alteration of competitive interactions (e.g. Hautier et al. 2009), evidence from the UK now suggests that these grasslands may be responding primarily to acidification and its impacts on soil chemistry (Stevens et al. 2010a). In this acid grassland community, competition for light may not be as important as in some other communities (e.g. prairie grasslands, Wedin & Tilman 1993) in determining the response to N deposition. Although there is likely to be some effect of eutrophication, the continual removal of plant material through grazing and/or cutting may prevent competition for light and nutrients from being a strong determinant of community composition. An increase in the proportion of grasses in this community may

simply reflect that many of the grasses found are very generalist species (e.g. *Agrostis capillaris*, *Festuca ovina*) or acid specialists (e.g. *Deschampsia flexuosa*, *Molinia caerulea*) that benefit from a reduction in forb cover. The strong relationship between forb richness and N deposition identified in the survey (Stevens et al. 2010) indicate that this is the strongest driver of the changes in the proportional changes in richness.

The slight increase in bryophytes as a proportion of species number is a surprising trend, although this relationship is very weak and may be a consequence of the decline in forb richness. However, if the increase in bryophytes as a proportion of total species richness is a genuine trend, this would support the theory that competition for light is less important because in a short sward where competition for light was intense, we would expect an impoverished bryophyte flora (Peintinger & Bergamini, 2006) and that bryophytes would form a small proportion of total richness. Total species richness of bryophytes declines slightly with increasing N deposition but this is also not a strong trend (Stevens et al. 2010).

For all of the functional groups, the proportion of richness shows weaker relationships with the oxidised and reduced components of N deposition considered when they are separately. However, in all cases the relationships between oxidised N deposition or reduced N deposition and the proportion of species richness are similar. This may be because they are correlated or because changes in species composition are slow reflecting chronic deposition over many years. The effects of recent changes in the ratio of reduced to oxidised N in deposition may not yet be apparent in the vegetation community. Although oxidised N and reduced N tend to have different sources (oxidised from burning fossil fuels and reduced from agricultural emissions), they are correlated within this data set. This makes it difficult to separate their effects through statistical means.

Soil chemistry

Stevens et al. 2004; 2006 reported a clear relationship between N deposition and soil pH and consequent mobilisation of metals within the soil (Stevens et al. 2009) in the UK sites and, although the relationship is still apparent in this larger European data set, it is not as strong as in the UK alone ($r^2=0.39$, Stevens et al. 2006; 2010). The relationship between N deposition and soil pH found here supports evidence from other, smaller-scale surveys (e.g. Skiba et al. 1989) and long-term monitoring studies (e.g. Blake et al. 1999) that have demonstrated evidence for widespread soil acidification related to N deposition or acid deposition in weakly buffered soils.

It is possible that the wide range of soil types and underlying geology encompassed in the mainland European sites, together with a greater range in grassland-management techniques, meant that trends in soil pH and aluminium concentration are not as clear in the large-scale European transect compared to the UK survey. Some of this variation is removed by looking at the Al:Ca ratio in the topsoil, but this only shows a weak relationship with N

deposition. The availability of reactive aluminium in the soil is clearly related to pH despite variations in soil type. This is consistent with the known solubility of aluminium from experimental acidification of soils (Ulrich 1991; Tyler & Olsson 2001).

The slightly stronger relationship between soil pH or metal concentrations and total acid deposition (rather than N deposition alone) indicates that soil acidification in Europe is still related to either current or previous S deposition. However, because N and S deposition are somewhat correlated it is difficult to determine their relative contributions. This is also true when considering the relative contributions of the oxidised and reduced components of N deposition, in this case, relationships do appear to be stronger with oxidised deposition than with reduced. The relationship between N deposition and soil pH has implications for the species composition of the grasslands, which are reflected in the importance of soil pH as a driver of species richness (Stevens et al. 2010). Reduction in pH and consequent mobilisation of metals could be changing the species composition from species typical of intermediate pH to acid-resistant species, especially considering that this habitat is already at the lower end of pH tolerance for most of the species typical of grasslands.

Given the variation in soil types and site conditions it is not surprising to see a lack of clear relationships between N deposition and soil nitrate and ammonium concentrations. In addition to soil variability, both nitrate and ammonium are readily utilised by plants and microbial communities, and nitrate is relatively mobile in the soil. Mixed-effects models showed that for both nitrate and ammonium concentration, climatic variables and altitude are important variables. Given that microbial processing of N is sensitive to climatic and seasonal variation and the direct impact these have on the amount of readily available N, this relationship is not surprising (Morecroft et al., 1992). A significant positive relationship between N deposition and soil ammonium concentration was observed for the UK alone ($r^2=0.34$; Stevens et al. 2006) adding further support to the hypothesis that increased variability in the soils, climate and site conditions in this larger study prevent trends being readily identified.

Although there is a relationship between total soil N and N deposition, this is weak and once one outlying point was removed the relationship was no longer significant. Given that leaching losses of N from these grasslands are likely to be quite low (Phoenix et al. 2003), it is possible that yet again soil variability, and particularly variation in soil organic matter content, is masking any changes in soil total N. The soil N results from the European survey are in agreement with results from the UK alone ($r^2=0.08$, Stevens et al. 2006) although the relationship is stronger in the European survey. Interestingly, C:N ratio increases with increasing N deposition (Fig. 3). This means that rather than N increasing relative to the amount of C as might be expected through the addition of N, C is actually increasing relative to N. Increased soil C in response to N deposition has been reported in several studies in different habitats (e.g. Knorr et al. 2005; de Vries et al. 2009). Increases in soil C relative to soil N are possibly related to increased productivity leading to increased litter and/or changes

in the decomposition rate of litter. Measurement of standing biomass, soil organic matter dynamics and litter decomposition would confirm whether this is the case in the acid grassland system investigated in this study. All of the grasslands in this survey were managed for agriculture either by cutting or grazing. This continual removal of plant material makes it less likely that changes in productivity will impact the ecosystem. Another possible explanation is reduced soil respiration leading to C accumulation in the soil as has been observed in forest ecosystems (e.g. Mo et al. 2007; Bowden et al. 2004; Burton et al. 2004). The clear relationship with soil pH suggests that the effect is related to acidification impacting on soil processes.

Plant-tissue chemistry

Many experimental studies have demonstrated relationships between N addition and plant tissue N content (e.g. Carroll et al. 2003; Gordon et al. 2001; Leith et al. 1999,) but these are not reflected in this gradient study. It is possible that short-term N additions in experimental applications are not fully representative of chronic N deposition leading to a different response from plants or background variation in N availability may be masking this trend across natural gradients. It is clear from the plant tissue chemistry results that responses are species-specific which may also account for some of the different results observed. For *A. Capillaries*, there were no significant relationships between N deposition and any of the tissue nutrient content measurements (N, C:N and N:P). *R. squarrosus* showed slightly different results, with a significant relationships observed between tissue N content and C:N ratio with N deposition, but not for N:P ratio. In the UK alone, the relationship between N deposition and tissue N was not observed (Stevens et al. 2006). Results are generally in good agreement with Stevens et al. 2006. *R. squarrosus* showed slightly different results, with a significant relationships observed between tissue N content and C:N ratio with N deposition but this relationship is very weak and is unlikely to be ecologically relevant. In the UK alone, the relationship between N deposition and tissue N was not observed (Stevens et al. 2006). This suggests that although this was the strongest of the relationships between tissue chemistry and N deposition recorded in this study, it is not necessarily suitable for application as an indicator of N deposition at a national scale. This conclusion is supported by an intensive investigation of experimental N additions to a similar grassland community who also found no relationship between N deposition and *R. squarrosus* tissue N content (Arroniz-Crespo et al. 2008).

There are a number of potential reasons that strong relationships between tissue-nutrient concentrations and N deposition are not observed in this study. In this gradient study, there are many different variables with the potential to affect tissue N content, including climatic and management variations. The mixed-effects models show that some of these variables are significantly related to tissue N content. In a controlled experimental situation, these may be less apparent. The lack of relationship between N deposition and plant-nutrient concentrations may also relate to the microbial processing of N in the soil resulting in

different amounts and forms of N being available to plants compared to that which is deposited. The microbial processing of N varies on a small spatial and temporal scale and is affected by a range of factors including temperature, soil moisture, soil pH and soil carbon content as well as N input (e.g. Riaz et al. 2008). Furthermore, the plants investigated in this study may be using the additional N deposited from the atmosphere for increased growth, as supported by optimal partitioning theory, which suggests that plants equalize nutrient exchange ratios in order to maximize the efficiency of resource use (Bloom et al. 1985). The collection of productivity data would confirm whether this is the case. An alternative possibility is that these plants may be showing a very plastic response to N deposition, with tissue nutrients changing in response to very short-term changes in N deposition levels (Dise & Gundersen, 2004). If this is the case, small-scale spatial and temporal variations in deposition, which are not accounted for in using a larger scale modelled N deposition data, may have a role to play in the variability of the results observed. Seasonal variation in resource allocation may also play a role in the lack of relationships between tissue nutrient concentrations and N deposition. Relationships between tissue N content and N deposition may not be apparent in above-ground tissues year-round and there may be seasonal variability in tissue N concentration which has not been eliminated in this study. An alternative indicator to tissue nutrient concentrations may be the use of metabolic fingerprints or enzymes such as phosphomonoesterase which have generated some interesting results from initial studies (Arroniz-Crespo et al. 2008; Gidman et al. 2006; Hogan et al. 2010).

Conclusion

Species composition of acid grasslands in Europe shows clear relationships with N deposition. The proportion of species richness that is made up of forb species is negatively associated with N deposition whilst the proportion of grasses increases. Soil chemistry results show no relationships between N deposition and soil N (extractable nitrate, ammonium and total N), but relationships between N deposition and soil pH and Al concentration can be observed. Soil C:N shows a positive relationship with N deposition. This result has important implications for carbon storage but further research is needed to determine the mechanism causing this increase. The results of this survey demonstrate that tissue N concentrations of the three species investigated are not suitable for use as indicators of N deposition. Some species may be more suitable, but before they are recommended for use as an indicator of N deposition, their response to chronic N deposition should be investigated outside of controlled experimental situations. These results clearly show a correlation between atmospheric N deposition and species composition and soil chemistry of European grasslands at ambient levels of N deposition suggesting that deposition levels need to be reduced to protect these grasslands. The results show that changes occur at all levels of deposition found within the region including impacts on vegetation community and soil below the critical load for N deposition for this habitat. This would suggest that achieving no damage to sensitive acid grasslands from N deposition is not a realistic goal and policy makers should instead aim to

minimise impacts on acid grasslands. The results also show that even at high deposition impacts continue to occur suggesting that further N additions to areas where the critical load is currently exceeded could cause further damage.

Acknowledgements

This project was funded by the European Science Foundation through the EURODIVERSITY-programme, and national funds were provided by DfG (Germany), NERC (United Kingdom), NWO (The Netherlands) and INRA, ADEME and Aquitaine Region (France). We are grateful to everyone who assisted with field and laboratory work, and conservation agencies and land owners who gave permission for sampling.

References

- Aerts, R., Chapin, F.S., 2000. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30, 1-67.
- Asman, W.A.H., van Jaarsveld, J.A., 2002. A variable-resolution transport model applied for NH_x in Europe. *Atmospheric Environment* 26A, 445-464.
- Berger, T.W., Inselsbacher, E., Mutsch, F., Pfeffer, M., 2009. Nutrient cycling and soil leaching in eighteen pure and mixed stands of beech (*Fagus sylvatica*) and spruce (*Picea abies*). *Forest Ecology and Management* 258, 2578-2592.
- Blake L., Goulding K.W.T., Mott C.J.B., Johnston A.E., 1999. Changes in soil chemistry accompanying acidification over more than 100 years under woodland and grass at Rothamsted Experimental Station, UK. *European Journal of Soil Science*, 50, 401-412.
- Bloom, A.J., Chapin, F.S., Mooney, H.A., 1985. Resource limitation in plants – an economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 363-392.
- Bowden, R.D., Davidson, E., Savage, K., Arabia, C., Steudler, P., 2004. Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest. *Forest Ecology and Management* 196, 43-56.
- Brunsting, A.M.H., Heil, G.W., 1985. The role of nutrients in the interactions between a herbivorous beetle and some competing plant species in heathlands. *Oikos* 44, 23-26.
- Burton, A.J., Pregitzer, K.S., Crawford, J.N., Zogg, G.P., Zak, D.R., 2004. Simulated chronic NO_3^- deposition reduces soil respiration in northern hardwood forests. *Global Change Biology* 10, 1080-1091.
- Carroll, J.A., Caporn, S.J.M., Cawley, L., Read, D.J., Lee, J.A., 1999. The effect of increased atmospheric nitrogen on *Calluna vulgaris* in upland Britain. *New Phytologist* 141, 423-431.
- Carroll, J.A., Caporn, S.J.M., Johnson, D., Morecroft, M.D., Lee, J.A., 2003. The interactions between plant growth, vegetation structure and soil processes in semi-natural acidic and calcareous grasslands receiving long-term inputs of simulated pollutant nitrogen deposition. *Environmental Pollution* 121, 363-376.

- Chapman, H.D., Pratt, P.F., 1985. *Methods for Analysis of Soils, Plants and Waters*. Agricultural Sciences Publications, California.
- Clark, C.M., Cleland, E.E., Collins, S.L., Fargione, J.E., Gough, L., Gross, K.L., Pennings, S.C., Suding, K.N., Grace, J.B., 2007. Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment. *Ecology Letters* 10, 596-607.
- de Vries, W., Solberg, S., Dobbertin, M., Sterba, H., Laubhann, D., van Oijen, M., Evans, C., Gundersen, P., Kros, J., Wamelink, G.W.W., Reinds, G.J., Sutton, M.A., 2009. The impact of nitrogen deposition on carbon sequestration by European forests and heathlands. *Forest Ecology and Management* 258, 1814-1823.
- Dise, N.B., Gundersen, P., 2004. Forest ecosystem responses to atmospheric pollution: linking the empirical with the experimental. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 4, 207-220.
- Erisman, J.W., Bleeker, A., Hensen, A., Vermeulen, A., 2008. Agricultural air quality in Europe and the future perspectives. *Atmospheric Environment* 42, 3209-3217.
- Fagerli, H., Aas, W., 2008. Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution* 154, 448-461.
- Falkengren-Grerup, U., 1995. Long-term changes in flora and vegetation in deciduous forests of southern Sweden. *Ecological Bulletins* 44, 215-226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320, 889-892.
- Gauger, T., Anshelm, F., Schuster, H., Erisman, J.W., Vermeulen, A.T., Draaijers, G.P.J., Bleeker, A., Nagel, H.-D., 2002. Mapping of ecosystems specific long-term trends in deposition loads and concentrations of air pollutants in Germany and their comparison with Critical Loads and Critical Levels. Institut fur Navigation, University of Stuttgart, Germany.
- Gidman, E.A., Stevens, C.J., Goodacre, R., Broadhurst, D., Emmett, B., Gwynn-Jones, D., 2006. Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology* 12, 1823-1833.
- Gordon, C., Wynn, J.M., Woodin, S.J., 2001. Impacts of increased nitrogen supply on high Arctic heath: the importance of bryophytes and phosphorus availability. *New Phytologist* 149, 461-471.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A., Hector, A., 2009. Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication. *Science* 324, 636-638.
- Johnston, A.E., Goulding, K.W.T., Poulton, P.R., 1986. Soil acidification during more than 100 years under permanent grassland and woodland at Rothamstead. *Soil Use and Management* 2, 3-10.
- Knorr, M., Frey, S.D., Curtis, P.S., 2005. Nitrogen additions and litter decomposition: a meta-analysis. *Ecology* 86, 3252-3257.
- Leith, I.D., Hicks, W.K., Fowler, D., Woodin, S.J., 1999. Differential responses of UK upland plants to nitrogen deposition. *New Phytologist* 141, 277-289.

- MAFF, 1986. The analysis of Agricultural Materials, Third Edition ed. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Monitoring Agricultural Resources (MARS), European Commission Joint Research Centre. <http://mars.jrc.it/mars/About-us/The-MARS-Unit> (Accessed November 2009)
- Mace, G., Masundire, H., Baille, J. (eds) 2005. Millenium Ecosystem Assessment Volume 1: Current States and Trends. Island Press, Washington.
- Maskell, L.C., Smart, S.M., Bullock, J.M., Thompson, K., Stevens, C.J., 2010. Nitrogen deposition causes widespread species loss in British habitats. *Global Change Biology* 16, 671-679.
- Mo, J.M., Brown, S., Xue, J.H., Fang, Y.T., Li, Z., Li, D.J., Dong, S.F., 2007. Response of nutrient dynamics of decomposing pine (*Pinus massoniana*) needles to simulated N deposition in a disturbed and a rehabilitated forest in tropical China. *Ecological Research* 22, 649-658.
- Morecroft, M.D., Marrs, R.H., Woodward, F.I., 1992. Altitudinal and seasonal trends in soil mineralization rate in the Scottish Highlands. *Journal of Ecology* 80, 49-56.
- Mountford, J.O., Lakhani, K.H., Kirkham, F.W., 1993. Experimental assessment of the effects of nitrogen addition under hay-cutting and aftermath grazing on the vegetation of meadows on a Somerset peat moor. *Journal of Applied Ecology* 30, 321-332.
- NEG-TAP, 2001. Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK. CEH, Edinburgh.
- Oke, T.R., 1987. Boundary layer climates, 2nd ed. Methuen, New York.
- Pearson, J., Stewart, G.R., 1993. Tansley Review No.56. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist* 125, 283-305.
- Peintinger, M., Bergamini, A., 2006. Community structure and diversity of bryophytes and vascular plants in abandoned fen meadows. *Plant Ecology* 185, 1-17.
- Phoenix, G.K., Booth, R.E., Leake, J.R., Read, D.J., Grime, P., Lee, J.A., 2003. Effects of enhanced nitrogen deposition and phosphorus limitation on nitrogen budgets of semi-natural grasslands. *Global Change Biology* 9, 1309-1321.
- Pieterse, G., Bleeker, A., Vermeulen, A.T., Wu, Y., Erisman, J.W., 2007. High resolution modelling of atmosphere-canopy exchange of acidifying and eutrophying components and carbon dioxide for European forests. *Tellus* 59B, 412-424.
- Pilkington, M.G., Caporn, S.J.M., Carroll, J.A., Cresswell, N., Lee, J.A., Emmett, B.A., Johnson, D., 2005. Effects of increased deposition of atmospheric nitrogen on an upland *Calluna* moor: N and P transformation. *Environmental Pollution* 135, 469-480.
- Pitcairn, C.E.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sutton, M.A., Fowler, D., Munro, R.C., Tang, S., Wilson, D., 1998. The relationship between nitrogen deposition, species composition and foliar nitrogen concentrations in woodland flora in the vicinity of livestock farms. *Environmental Pollution* 102, 41-48.
- R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Riaz, M., Mian, I.A., Cresser, M.S., 2008. Extent and causes of 3D spatial variations in potential N mineralization and the risk of ammonium and nitrate leaching from an N-impacted permanent grassland near York, UK. *Environmental Pollution* 156, 1075-1082.
- Ryan, J., Estefan, G., Rashid, A., 2001. *Soil and Plant Analysis Laboratory Manual*, Second Edition ed. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770-1774.
- Schwickerath, M., 1944. Das Hohe Venn und seine Randgebiete. *Pflanzensoziologie* 6, 1-278.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., 2002. Effects of NH₃ fumigation on the frost hardiness of *Calluna* - Does N deposition increase winter damage by frost? *Phyton-annales rei botanicae* 42, 183-190.
- Skiba, U., Cresser, M.S., Derwent, R.G., Futton, D.W., 1989. Peat acidification in Scotland. *Nature* 337, 68-70.
- Smith, R.I., Fowler, D., Sutton, M.A., Flechard, C., Coyle, M., 2000. Regional estimation of pollutant gas dry deposition in the UK: model description, sensitivity analyses and outputs. *Atmospheric Environment* 34, 3757-3777.
- Stevens, C.J., Dise, N.B., Mountford, J.O., Gowing, D.J., 2004. Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science* 303, 1876-1879.
- Stevens, C.J., Dise, N. B., Gowing, D. J., Mountford, J. O., 2006. Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology* 12, 1823-1833.
- Stevens, C.J., Dise, N.B. and Gowing, D.J., 2009. Regional trends in soil acidification and metal mobilisation related to acid deposition. *Environmental Pollution* 157, 313-319.
- Stevens, C.J., Maskell, L.C., Smart, S.M., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Gowing, D.J., 2009a. Identifying indicators of atmospheric nitrogen deposition impacts in acid grasslands. *Biological Conservation* 142, 2069-2075.
- Stevens, C.J., Duprè, C., Dorland, E., Gaudnik, C., Gowing, D.J.G., Bleeker, A., Diekmann, M., Alard, D., Bobbink, R., Fowler, D., Corcket, E., Mountford, J.O., Vandvik, V., Aarrestad, P.A., Muller, S., Dise, N.B., 2010. The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution* 158, 2940-2945.
- Stevens, C.J., Thompson, K., Grime J.P., Long, C.J., Gowing, D.J.G. 2010a. Contribution of acidification and eutrophication to declines in species richness of calcifuge grasslands along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Functional Ecology*, 24,478-484.
- Throop, H.L., Lerdau, M.T., 2004. Effects of nitrogen deposition on insect herbivory: implications for community and ecosystem processes. *Ecosystems* 7, 109-133.
- Tyler G., Olsson T., 2001. Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to soil acidity. *European Journal of Soil Science*, 52, 151-165.

- Wilson, E.J., Wells, T.C.E., Sparks, T.H., 1995. Are calcareous grasslands in the UK under threat from nitrogen deposition? - an experimental determination of a critical load. *Journal of Ecology* 83, 823-832.
- Ulrich B., 1991. An ecosystem approach to soil acidification. In: *Soil Acidity* (eds. Ulrich, B., Sumner, M.E.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 28-79.
- Van Jaarsveld, J.A., 1995. Modelling the long-term atmospheric behaviour of pollutants on various spatial scales. University of Utrecht, The Netherlands.
- Van Jaarsveld, J.A., 2004. The operation priority substances model. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- Wedin, D., Tilman, D., 1993. Competition among grasses along a nitrogen gradient: initial conditions and mechanisms of competition. *Ecological Monographs* 63, 199-229.

-ANNEXE 4-

Article 5 Addressing the impact of atmospheric nitrogen
deposition on Western European grasslands

Carly Stevens, David Gowing, Katherine Wotherspoon, Didier Alard, Per
Arild Aarrestad, Albert Bleeker, Roland Bobbink, Martin Diekmann, Nancy
Dise, Cecilia Duprè, Edu Dorland, Cassandre Gaudnik, Suzanne Rotthier,
Merel Soons & Emmanuel Corcket,

Environmental Management (in press)

Addressing the impact of atmospheric nitrogen deposition on Western European grasslands.

Stevens, C.J.^{1,2*}, Gowing, D.J.G.¹, Wotherspoon, K.A.¹, Alard, D.³, Aarrestad, P.A.⁴, Bleeker, A.⁵, Bobbink, R.⁶, Diekmann, M.⁷, Dise, N.B.⁸, Duprè, C.⁷, Dorland, E.^{9,10}, Gaudnik, C^{3c}, Rothier, S⁹, Soons, M.B.⁹ and Corcket, E³.

¹ Department of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK.

³ University of Bordeaux. UMR INRA 1202 Biodiversity, Genes and Communities, Equipe Ecologie des Communautés, Bâtiment B8 - Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France.

⁴ Norwegian Institute for Nature Research, PBox 5685 Sluppen, NO-7485 Trondheim, Norway.

⁵ Department of Air Quality & Climate Change, Energy Research Centre of the Netherlands, PO Box 1, 1755, ZG Petten, The Netherlands.

⁶ B-WARE Research Centre, Radboud University, PO Box 6558, 6503 GB Nijmegen, The Netherlands.

⁷ Institute of Ecology, FB 2, University of Bremen, Leobener Str., DE-28359 Bremen, Germany.

⁸ Department of Environmental and Geographical Science, Manchester Metropolitan University, Manchester M1 5GD, UK.

⁹ Ecology and Biodiversity Group, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands.

¹⁰ KWR Watercycle Research Institute, P.O.Box 1072, 3430 BB Nieuwegein, The Netherlands

* Corresponding author:

Dr. Carly J. Stevens

Department of Life Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, MK7 6AA, UK.

Tel: +44 1524 593937

Fax: +1524 593985

Abstract

There is a growing evidence base demonstrating that atmospheric nitrogen deposition presents a threat to biodiversity and ecosystem function in acid grasslands in Western Europe. Here, we report the findings of a workshop held for European policy makers to assess the perceived importance of reactive nitrogen deposition for grassland conservation, identify areas for policy development in Europe and assess the potential for managing and mitigating the impacts of nitrogen deposition. The importance of nitrogen as a pollutant is already recognized in European legislation, but there is little emphasis in policy on the evaluation of changes in biodiversity due to nitrogen. We assess the potential value of using typical species, as defined in the Habitats Directive, for determining the impact of nitrogen deposition impact on acid grasslands. Although some species could potentially be used as indicators of nitrogen deposition, many of the typical species do not respond strongly to nitrogen deposition and are unlikely to be useful for identifying impact on an individual site. We also discuss potential mitigation measures and novel ways in which emissions from agriculture could be reduced.

Keywords: Acid grasslands, biodiversity, Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (CLTRAP), nitrogen deposition, species-rich *Nardus* grassland.

Background

The natural global nitrogen (N) cycle has been transformed by human activities as a consequence of agricultural intensification and fossil fuel combustion. Between 1860 and 1995 the global creation of reactive N (all forms of N that are biologically or photochemically active) increased from 15 Tg N yr⁻¹ to 156 Tg N yr⁻¹. Between 1995 and 2005, it increased by a further 31 Tg N yr⁻¹ to 187 Tg N yr⁻¹ (Galloway and others 2008). With continued growth of the world population and increasing demand for food, pressures on the global N cycle are set to increase (Tilman 1999).

Nitrogen oxides are mainly produced by fossil fuel combustion in transport, power generation and industrial processes whereas 90% of ammonia emissions come from agricultural sources (mainly fertilizers and animal manure) (Erisman and others 2008). Excess reactive N in the atmosphere is deposited to terrestrial and aquatic ecosystems as wet or dry deposition. Wet deposition occurs when soluble N compounds are dissolved in rain and cloud drops; dry deposition consists of gases and particles that are deposited directly to surfaces. In Europe as a whole, deposition of N showed a slight decline between 1980 and 2003 (Fagerli and Aas 2008), but in many areas, levels of deposition remain above those that are known to have an impact on semi-natural ecosystems. In other parts of the world, such as developing nations and growing economies, N deposition is increasing (Galloway and others 2008). These changes are in contrast to sulfur (S) for which emissions have been reduced by between 90 and 70% and deposition has declined rapidly since the 1970s (Fowler and others 2007).

Atmospheric N deposition can potentially have a wide range of effects on semi-natural ecosystems including direct toxicity, increased sensitivity to secondary stress, acidification and eutrophication (Bobbink and others 2010). Acidification can be caused directly by acid deposition (N and S), but also indirectly through leaching of basic cations, soil microbial processes and plant uptake. Increased soil acidity can result in an increased solubility of metals and a reduced availability of nutrients (Tyler and Olsson 2001). In Europe, plant species diversity tends to decline with increasing soil acidity and so species composition and richness can be impacted (Johnston and others 1986; Falkengren-Grerup 1995; Stevens and others 2004). Because N is the limiting nutrient in many semi-natural terrestrial ecosystems, the addition of N also has the potential to increase primary productivity. N deposition may be less of a threat where phosphorus is the limiting nutrient. For plant communities the consequence of this increase in productivity can be a shift towards domination by species with a high competitive ability under high resource availability (e.g. Bobbink and others 1998; Hautier and others 2009).

In acid grasslands (found on soils with a pH of around 5 or below), the main effects on plant communities are a loss of species richness (Duprè and others 2010; Maskell and others 2010; Stevens and others 2010a), especially forbs, an increase in the prevalence of competitive species (e.g. Wilson and others 1995), and an increase in the prevalence of acid tolerant species (e.g. Stevens and others 2010b) resulting in a species composition which is not typical of this community. These changes are a cause for concern because they represent a loss of biodiversity across large areas of Western Europe. Changes in plant tissue chemistry have also been observed on the gradient of deposition (Gidman and others 2006; Stevens and others In press).

Semi-natural grasslands are an important component of European agriculture, supporting extensive grazing and providing hay. They also support a wide range of plant, invertebrate and bird species. Acid grasslands are found throughout Europe in both upland and lowland areas. They were formerly widespread but, in some areas of Europe, have been heavily impacted by land-use change and agricultural abandonment (Ellenberg 1996). The habitat we focus on is identified in The Habitats Directive and is a subgroup of the Natura 2000 habitat species-rich *Nardus* grassland.

Focusing on grassland systems, particularly acid grasslands, this paper aims to assess the perceived threat of N deposition to biodiversity, identify relevant policy drivers, assess the potential for EU Habitats Directive ‘typical species’ to be used as indicators of N deposition and identify management options for mitigating the effects of N deposition. We also identify outstanding policy-related questions that scientists and policy makers need to address to effectively protect biodiversity. To do this, we report on the results of a workshop held for policy makers concerned with N deposition in Western Europe.

Sala and others (2000) identified the five most important determinants of changes in biodiversity on a global scale: changes in land-use, increasing atmospheric CO₂ concentration, increasing N deposition and acid rain, climate change, and biotic exchanges (introduction of exotic species). They used a series of scenarios of predicted future change to identify the relative effects of these drivers on biodiversity by the year 2100. For global biodiversity, land-use change was considered the greatest threat followed by climate change and N deposition. The relative importance of these drivers differed between habitats with N deposition being among the top three drivers for eight out of ten terrestrial biomes and the most important in northern temperate forests.

The Millennium Ecosystem Assessment also identified N and sulfur deposition together with fertilization as amongst the most important threats to biodiversity (Mace and others 2005). It concludes that N inputs are a threat to biodiversity at the biome and species level.

Both of these global studies are concerned with the assessment of threat to ecosystems at a global level, whereas this paper is primarily concerned with a single vegetation type (acid grassland) in Western Europe.

Perceived importance of N deposition as a threat to biodiversity

In order to assess the perceived threat of N deposition on biodiversity, we asked participants at a workshop for policy makers and others concerned with environmental policy (with a focus on national or European conservation and biodiversity policy) to give their opinions. Workshop participants came from nine countries across Western Europe (Denmark, France, Germany, Ireland, Netherlands, Norway, Sweden, Switzerland, United Kingdom). The workshop presented results of the European Science Foundation project ‘BEGIN - Biodiversity of European Grasslands – Impacts of Nitrogen Deposition’ and was held in October 2009 in Barsac, Gironde, France. The workshop addressed the following topics: identification of drivers of grassland habitat change, the use of indicators in assessing impacts of N deposition on grasslands and mitigation of impacts through responsive management. In order to assess the perceived importance of N deposition on grasslands, we asked stakeholders at the workshop to assess the relative importance of ten drivers of biodiversity loss in grasslands ranking them from the most important (score 10) to the least important (score 1). Threats to the biodiversity of acid grasslands may differ at the Western European scale to those that we see at a global scale, so the possible drivers that delegates considered were threats specific to grassland biodiversity over the next 20 years. The suggested drivers were: atmospheric N deposition, atmospheric sulfur deposition, intensification of agriculture (including addition of inorganic fertilizers), abandonment of management, fragmentation of habitats, climate change, overgrazing, invasion by exotic species, recreation and tourism pressures and soil compaction. There was also an option to add further drivers.

Abandonment of management was the category that was most commonly rated as the greatest threat to biodiversity (45% of delegates), followed by intensification of agriculture and atmospheric N deposition. These were rated as the top three priorities for many of the delegates as can be seen by examining the average scores (Fig. 1). Afforestation and building development were both identified as a threat by one delegate each.

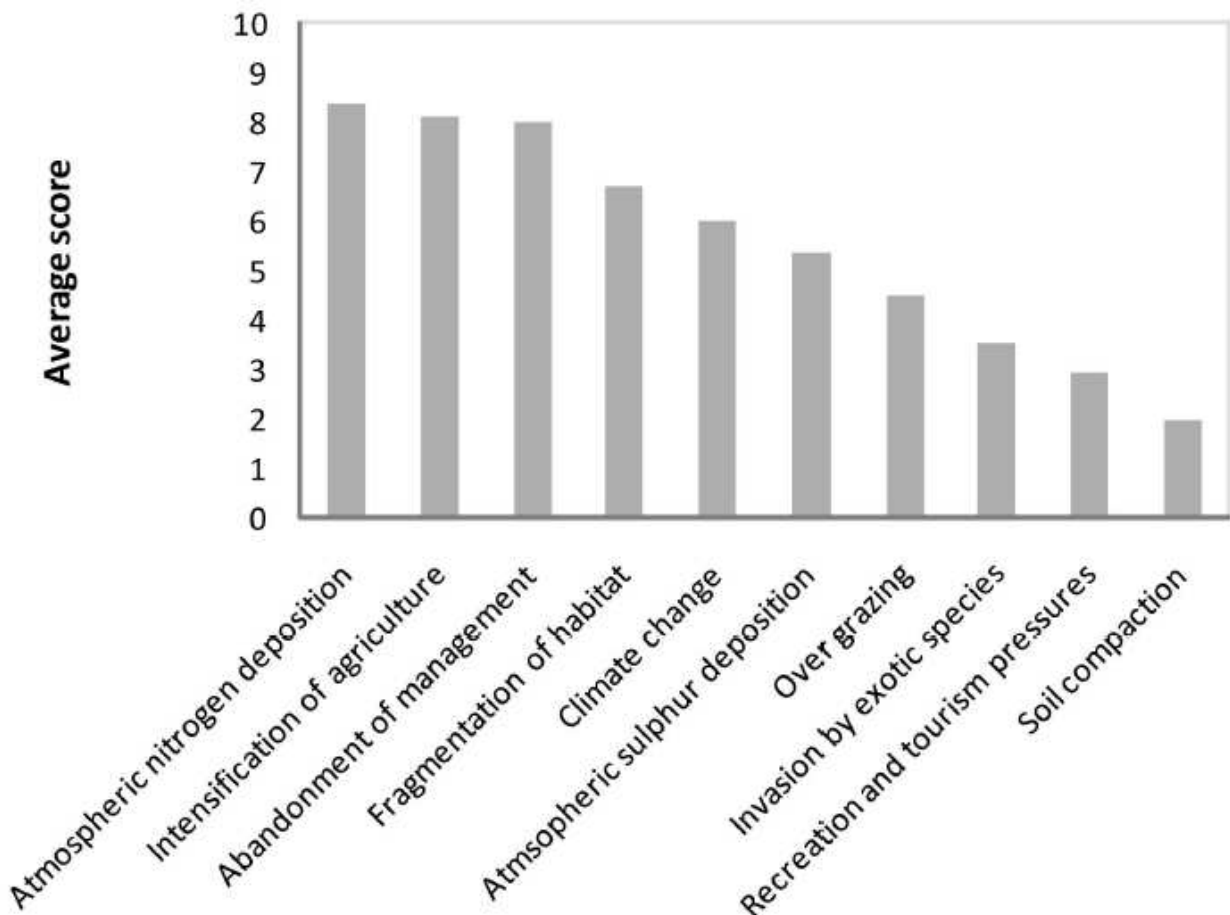


Fig. 1. Average scores allocated by 18 delegates from western Europe to identify the most important drivers of grassland biodiversity over the next 20 years. A high score was allocated to the greatest threats.

The high score allocated to N deposition reflects the perceived threat that N deposition presents to biodiversity. It also reflects the awareness policy makers have of the problems that N deposition presents. However, that these delegates participated in the workshop already indicated that they were concerned about this issue and the impacts it may be having in their countries. The results also reflect the transboundary and widespread nature of the threat presented by N deposition (Fagerli and Aas 2008). Differences in allocation of scores reflect personal opinion, but also national priorities and policy. In a country such as the Netherlands, where N deposition is well publicized and levels of deposition are high but declining as a result of successful introduction of abatement measures (Netherlands Environmental Assessment Agency, 2005), we saw a higher ranking than in a country like Ireland, where N deposition is relatively low. In other parts of the world, the perceived importance of N

deposition as a driver of species change will vary depending on awareness and the perceived importance of other issues. For example, in Eastern Europe N deposition is high (Dentener and others, 2006) and is thought to be impacting on vegetation community composition (Hejcman and others, 2009) but issues associated with land use change and abandonment are more likely to be considered of high priority (Sikor, 2003).

Nitrogen deposition in European Policy

The transboundary nature of N deposition and other air pollutants means that European legislation and international conventions are very important in dealing N emission and its impact on biodiversity. Key policy related to air pollution includes the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (CLRTAP), National Emission Ceilings Directive (2001/81/EC), Large Combustion Plant Directive (2000/80/EC), Ambient Air Quality Assessment and Management Directive (96/62/EC) and Integrated Pollution Prevention and Control Directive (91/61/EC and 2008/1/EC). However, although all the above directives are concerned with reducing air pollution and setting limits for N emissions, concentrations or deposition rates, many of these pieces of legislation do not directly consider the impact of the pollutants on semi-natural habitats. The CLRTAP is the main exception to this generalization, considering impacts on human health and environment. Indeed, of the seven International Co-operative Programmes (ICPs) reporting to the Working Group on Effects for the CLRTAP, five consider air pollution impacts on biodiversity.

The 1999 Gothenburg Protocol to abate acidification, eutrophication and ground-level ozone sets out an obligation to reduce emissions of sulfur, N and volatile organic compounds and ambient concentrations of ozone below specified levels. Parties are required to monitor emissions, ambient concentrations and deposition and collect information on the effects of these pollutants on human health, terrestrial and aquatic ecosystems and materials. The Gothenburg Protocol also sets out critical loads and levels for air pollutants. A critical load is defined as “a quantitative estimate of an exposure to one or more pollutants below which significant harmful effects on specified sensitive elements of the environment do not occur, according to present knowledge” (ICP Modelling and Mapping, 2004; Nilsson and Grennfelt, 1988). Empirical critical loads for N deposition are set for a range of habitats (Achermann and Bobbink 2003) and are based on expert knowledge and research. They consider the impacts of N on biodiversity, such as an increase in the dominance of N-favored species, decreases in diversity and changes in soil chemistry. Empirical critical loads are regularly revised to take account of the most up-to-date scientific knowledge. Exceedance of these critical loads can be mapped and provide a tool for determining the potential damage of N deposition.

Biodiversity policy is also important for assessing the impact of N deposition. The UN Convention on Biological Diversity (CBD) and the Ramsar Convention both have the potential to protect habitats from the deleterious effects of N deposition (see Bleeker and others in press) and critical-load exceedance for N deposition is used as one of the indicators

in ‘Streamlining European 2010 Biodiversity Indicators’ (EEA 2007). Relevant European legislation includes the Directive on the Conservation of Wild Birds (2009/147/ES) and on The Conservation of Natural Habitats and of Wild Fauna and Flora Directive (92/43/EEC) (The “Habitats Directive”). The Habitats Directive requires member states to take measures to ensure habitats and wild species are in a favorable conservation status.

Conservation management tools and options

Detection of N deposition impacts using of ‘Typical Species’ as indicators

In order to fulfill the requirement of the Habitats Directive, member states are required to undertake surveillance of the conservation status of the natural habitats and species and to produce a report every six years. A number of methods are used to define ‘favorable status’ for each habitat, including habitat range and area, and presence of typical species. Typical species are those which can be considered good indicators of favorable habitat quality, are sensitive to changes in the condition of the habitat and are detectable by non-destructive means (European Commission 2006). Typical species are defined by each member state and are species considered typical of the habitat. If these species were suitable as indicators of N deposition impact, they would be very useful for conservation managers.

220

We undertook an analysis of acid grassland survey data from Western Europe to determine whether Habitats Directive typical species are suitable for use as indicators of N deposition. Typical species were taken from the Habitats Directive Article 17 database (EEA 2008). Only four countries submitted lists of typical species to the European Environment Agency for species-rich *Nardus* grassland in the Atlantic region: Netherlands, Ireland, France and Germany. This gave a total of 55 typical species with some species reported for more than one country (Table 1).

Table 1. Typical species for dry acid grassland (habitat code 6230) in the Atlantic region for countries that submitted data to the Habitats Directive Article 17 database (European Environment Agency, 2008). Species shaded grey occurred within more than 5% of the the acid grasslands surveyed.

Typical species	Country
<i>Achillea millefolium</i>	IE
<i>Agrostis capillaris</i>	IE
<i>Agrostis curtisii</i>	FR
<i>Antennaria dioica</i>	DE
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	IE
<i>Arnica montana</i>	DE
<i>Avenula lodunensis</i>	FR
<i>Botrychium lunaria</i>	DE

<i>Carex arenaria</i>	FR
<i>Carex ericetorum</i>	NL
<i>Carex pallescens</i>	DE
<i>Carex panicea</i>	DE
<i>Carex pilulifera</i>	DE, IE
<i>Chamaespartium sagittale</i>	DE
<i>Dactylorhiza viridis</i>	NL
<i>Danthonia decumbens</i>	FR, IE
<i>Dianthus deltoides</i>	FR
<i>Euphrasia stricta</i>	DE
<i>Festuca filiformis</i> (sub-species of <i>F. ovina</i>)	DE, FR
<i>Festuca ovina</i>	IE
<i>Galium saxatile</i>	DE, FR, IE, NL
<i>Gentiana pneumonanthe</i>	DE
<i>Hypericum maculatum</i>	DE, IE
<i>Hypochaeris radicata</i>	DE
<i>Jasione montana</i>	FR
<i>Juncus squarrosus</i>	DE, IE
<i>Lathyrus linifolius</i> (synonym of <i>L. montanus</i>)	DE
<i>Lathyrus montanus</i>	IE
<i>Luzula campestris</i>	DE, FR
<i>Luzula multiflora</i>	IE
<i>Meum athamanticum</i>	DE
<i>Narcissus bulbocodium</i>	FR
<i>Nardus stricta</i>	DE, FR, IE, NL
<i>Pedicularis sylvatica</i>	DE, FR, IE, NL
<i>Platanthera bifolia</i>	DE, NL
<i>Polygala serpyllifolia</i>	DE, FR, IE, NL
<i>Polygala vulgaris</i>	DE, IE
<i>Potentilla erecta</i>	DE, FR
<i>Pseudarrhenatherum longifolium</i>	FR
<i>Pseudorchis albida</i>	IE
<i>Rhynchospora alba</i>	IE
<i>Rumex acetosella</i>	FR
<i>Sedum anglicum</i>	FR
<i>Serapias lingua</i>	FR
<i>Spiranthes spiralis</i>	NL

<i>Stachys officinalis</i>	NL
<i>Succisa pratensis</i>	IE
<i>Thymus pulegioides</i>	FR
<i>Veronica officinalis</i>	DE
<i>Viola canina</i>	DE, FR, IE
<i>Viola lactea</i>	FR
<i>Viola riviniana</i>	IE

The data used in this analysis are from 153 *Violion caninae* grasslands in ten countries (Belgium, Denmark, France, Germany, Great Britain, Ireland, Isle of Man, Netherlands, Norway and Sweden). The grasslands surveyed were selected to cover the range of atmospheric N deposition in Western Europe and to give a good range of sites at different latitudes and longitudes for different deposition values. Using the results of this international survey of *Violion caninae* grasslands (Stevens and others 2010a) across the Atlantic biogeographic region of Europe, the value of selected typical species for detecting the impact of atmospheric N deposition can be assessed for the Natura 2000 habitat ‘Species-rich *Nardus* grassland’ (habitat code 6230). The definition of species-rich *Nardus* grassland is slightly broader than the definition of the association *Violion caninae* grassland (Schwickerath 1944), but *Violion caninae* can be considered a sub-type of the species-rich *Nardus* grassland (Galvnek and Jank 2008; Krahulec 1985).

Many typical species did not occur in sufficient numbers (more than 5% of sites) in our database to be included in this ordination analysis. There are two potential reasons for this. The first is that if a species is particularly common on a regional level, but not at a broader level, they may make an ideal typical species for a country, but our dataset may not have sufficient sites within that region for it to appear in our dataset at more than 5% of all sites. The second potential reason that a typical species may not be found in our dataset is that we have not covered the full range of types of species-rich *Nardus* grassland as described in Natura 2000. Nevertheless, these data can give us an indication of how suitable a species may be for assessing the impact of N deposition.

Fig. 2 shows the position of the 55 selected Article 17 typical species within an ordination diagram of a canonical correspondence analysis created using data gathered in the above-mentioned European survey. There were no strong geographical trends in the data (Stevens and others, 2011). For all of the sites, N deposition was modeled using the best available deposition model. National models were used for Germany (Gauger and others 2002), the Netherlands (Asman and van Jaarsveld, 2002; Van Jaarsveld, 1995, 2004) and Great Britain (NEG-TAP 2001; Smith and others 2000). For all other countries, the EMEP-based IDEM model (Pieterse and others 2007) was used. Canonical correspondence analysis (CANOCO 4.5 (ter Braak and Smilauer 2002)) was used to show the distribution of species in relation to N deposition. In this ordination, N and sulfur (S) deposition were used as variables

in the analysis whilst soil pH, aluminum concentration, base cation concentration, nitrogen content, carbon content, C:N ratio, latitude, longitude and mean daily maximum temperature were used as co-variables.

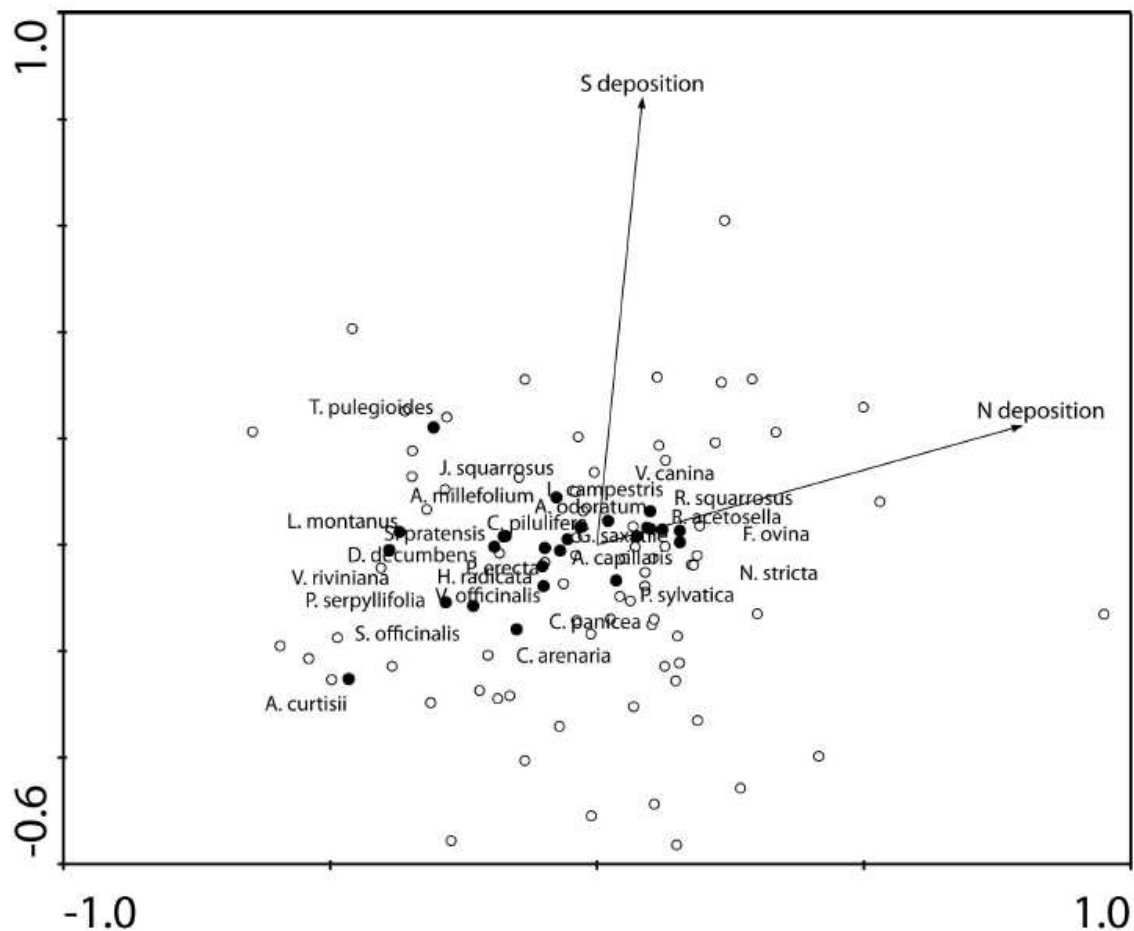


Fig. 2. Ordination diagram of a canonical correspondence analysis showing species from 153 *Violion caninae* grasslands in the Atlantic biogeographic region of Europe. Filled circles show Habitats Directive typical species for species-rich *Nardus* grassland and empty circles show other species. The empty circles have not been individually labelled for clarity; a full discussion of species associated with high and low levels of N deposition is given in Stevens and others (2011). The arrows represent increasing total nitrogen deposition rate (N) and increasing total sulphur deposition rate (S). Eigen values for axis 1 and 2 are 0.097 and 0.276 respectively. The total inertia of the analysis was 3.79.

Species to the right of the ordination diagram at the top of the arrow are more commonly found at high N deposition (based on their occurrence and cover) within this dataset, those in the centre are neutral with regards to N deposition and those to the left are more commonly found at lower N deposition. It is those species on the left that are likely to be most suitable as indicators of low nitrogen deposition impact. As can be seen from Fig. 2, typical species are scattered across the ordination diagram, so using typical species lists from the Netherlands, Ireland, France and Germany, this group of species is not suitable as an indicator of N deposition impact in this habitat. Analysis of each of these countries individually and comparison with national lists showed a similar scatter of typical species

with respect to pollutant deposition (data not shown). There are some individual species that may be suitable, most notably *Agrostis curtisii* (typical species in France), *Stachys officinalis* (typical species in the Netherlands) and *Polygala serpyllifolia* (typical species in Ireland and Germany). All of these species are relatively common across Western Europe (although *Agrostis curtisii* has a restricted distribution in the western warm oceanic regions) and so merit further investigation of their potential as indicators of N deposition in this particular region.

Most typical species are not suitable indicators of N deposition at a Western European scale, indeed, many of the species selected as typical species are too common to be useful indicators even at a national scale. Given the widespread nature of this result in Western Europe, it is likely that this will be true throughout the whole of Europe. Alternative species may provide more suitable indicators although other measures, such as Ellenberg N scores, species richness or grass:forb ratio may be more useful, particularly if temporal changes in these measures could be assessed (Duprè and others 2010; Stevens and others 2009).

Mitigation of acidification and eutrophication

Detecting the impact of atmospheric N deposition is only the initial stage of dealing with the problem. Once affected sites are identified, appropriate management should be put in place to mitigate the effects of deposition. There are a number of different options for the management of grasslands to control the impact of N deposition. These fall into two categories, measures to mitigate acidification and measures to mitigate eutrophication.

The main method of mitigating soil acidification is liming. Liming has a long history of use in agricultural sciences, indeed the Park Grass Experiment at Rothamsted Experimental Station in Hertfordshire, England commenced experimental lime addition in 1903 (Silvertown and others 1994). Liming has been widely used to combat acidification from atmospheric pollutants and nutrient addition in many habitats, including grasslands (e.g. Blake and others 1999; De Graaf and others 1998). Lime (usually calcium carbonate) reduces soil acidity by exchange of calcium or magnesium ions with hydrogen ions on soil particles resulting in a higher soil pH. In a heathland-catchment liming experiment, Dorland and others (2005b) found liming resulted in higher soil pH, higher concentrations of base cations and a reduced Al:Ca ratio. Despite this, there was only a small positive response by vegetation, but changes in species composition were observed including the cessation of vigorous growth of some competitive species and an increase in rarer species. The addition of too much lime can damage plants and the effects of liming can vary depending on the site history, soil type, amount of N in the soil and the plant species present. In areas fed by base-rich groundwater, raising water-tables in the soil has also been used to combat acidification (Roelofs and others 1996).

Where species composition is changing as a result of eutrophication and consequent increases in productivity, measures can be taken to reduce competition for light and remove nitrogen from the system. This could include an increase in cutting frequency or grazing intensity. This method is commonly used in the restoration of grassland from former agricultural land (Walker and others 2003) and can change species composition, reducing the cover of productive grasses promoted by the addition of N. Additional winter grazing to disturb the grassland sward is also an option (Jones and Hayes, 1999). The removal of biomass by cutting and taking off the hay also removes N from the system with the potential to reduce nutrient status of the soil and reduce productivity in the long-term. However, the rate of nutrient removal by this method is usually low (Hejman and others 2010), and so it may take some time for a significant change to be detected (Olf and Bakker 1991). Burning also provides a means of biomass removal and is traditionally used as a management tool in some habitats (e.g. heathlands,) but it is not commonly used in grasslands and may not be well accepted by the general public, because it produces greenhouse gases, particulate pollution and other air pollutants, leaves large areas looking unsightly and generates safety concerns. Another method that has been tested experimentally for the removal of reactive N from soils is the addition of carbon (C). C addition in the form of sucrose, sawdust, starch or cellulose increases the C:N ratio of soil and can induce microbial communities to immobilize N in the soil, thus making it inaccessible to plants (e.g. Eschen and others 2007; Török and others 2000).

Turf stripping or cutting is the most dramatic method for the removal of nutrients, but it also removes acidified surface soil, and so can address both acidification and eutrophication problems. Turf stripping has been used extensively in some countries, especially the Netherlands, for the restoration of heathland (De Graaf and others 1998; Dorland and others 2005a). Topsoil removal is an alternative method that has been used for the restoration of grasslands (e.g. Buisson and others 2006) but it presents similar problems to turf stripping. Although turf stripping has been experimentally trialed in grasslands (e.g. Jansen and Roelofs 1996; Pywell and others 2002), it is an expensive form of management and in addition to removing nutrients and acidified soil, it also removes the soil seed bank and organic matter, as well as reducing the water holding capacity of the soil (van den Berg and others 2003a). The removal of the soil seed bank means that if the local species pool is already depleted, appropriate species may not be able to re-colonize and may need to be re-introduced (Dorland and others 2004; van den Berg and others 2003b). Dispersal into large cleared areas is usually not sufficient for rapid colonization by target species, and would require large source populations nearby. For perennial species that do not produce large annual seed crops, unassisted dispersal is likely to be quite limited (e.g. Soons and others 2005). To facilitate re-colonization of cleared areas, hay from target communities can be spread out to supply seeds and improve micro-environmental conditions. This has been successful in some situations (Poschlod and Biewer 2005; Cioffait-Gombault and others 2010), but is limited by the supply of hay from nearby source sites.

Many of these measures are unsuitable for application at a landscape scale and it would only be appropriate to apply them to sites of conservation importance or other targeted areas. Currently it falls to landowners to mitigate against the effects of N deposition. When conservation organizations are responsible for land management, such mitigation may be possible albeit expensive, but in many cases the land is owned by private individuals, so appropriate management needs to be promoted through agri-environment schemes. Mitigation measures to reduce the effect of N deposition are not currently incorporated into these schemes in many parts of Europe, but some of the measures described above are feasible at different scales. Farmers need incentives to encourage appropriate management. Payment based on results of management, such as an increase in species richness or reduction in eutrophic species, could increase motivation and help farmers to value their land as a conservation resource but may reduce participation in the scheme if farmers are concerned about the probability of success.

Emission management options

Managing the effects of N deposition is frequently expensive, impractical and in some cases can change the landscape and the ecosystem dramatically. The only truly effective and sustainable method to reduce the impact of N is through the reduction of N emissions.

226

There are a number of potential methods that could be used to reduce emissions of N. Emissions of N oxides from industrial sources are already controlled within Europe to a large extent through the legislation outlined above. However, this is not always the case world-wide. Options for the control of reduced N emissions from agriculture have poor uptake and oxidized N emissions from traffic and transport are mainly mitigated through efforts to reduce CO₂ emissions.

In principle, the Habitats Directive provides protection for designated areas of conservation importance. Under the Directive, projects cannot be approved if they are assessed to have an adverse effect on a Special Area of Conservation (SAC) or Special Protection Area (SPA). However, this decision can only be made if an appropriate review and assessment is undertaken which, for many agricultural activities resulting in increased N deposition to nearby sites, is not the case. Legislative control of N emissions from agriculture, and indeed measuring and monitoring of emissions, provides many challenges due to the diffuse nature of emissions and the cost of emission reduction technology. Existing options for reducing N emissions from agriculture include direct injection of fertilizers and slurries, suitable storage of animal waste, utilizing technologies to minimize fertilizer use and filtering air before it leaves animal housing areas but all of these options have the potential to incur additional cost which may make them unattractive to farmers.

Workshop delegates suggested a number of possible options for reducing emissions. Diffuse nitrate pollution to water is currently controlled in Europe through the Nitrates

Directive (91/676/EEC,) which requires Member States to identify areas where groundwater nitrate concentrations exceed 50 mg l^{-1} or are at risk of doing so. These areas are designated as Nitrate Vulnerable Zones (NVZs) and Member States must establish ‘Action Programmes’ in order to reduce and prevent further nitrate contamination. A similar approach could be taken to N emissions to the atmosphere.

Slurry spreading is an agricultural activity, which is currently managed for the protection of water quality, but could additionally be managed for air quality. For example, regulations in the UK (The Nitrate Pollution Prevention Regulations 2008) currently prohibit application of farmyard manure to grassland in NVZs between the mid-September and mid-January, when biological uptake is lowest and runoff is often high. If slurry spreading were also not permitted during the hottest months of the year, this would minimize ammonia volatilization.

Reduced meat production and the potential to educate the public to reduce meat consumption is an effective way to reduce ammonia emissions. World-wide meat consumption increased dramatically between 1961 and 1994, and although the rate of growth in *per capita* meat consumption has now slowed in the developed world, this is because it had already reached a very high level (Rosegrant and others 1999). Using incentives and education to reduce meat consumption could have environmental and health benefits. Initiatives such as ‘meat free Mondays’ (<http://www.supportmfm.org/>), meat free days in schools such as seen in Ghent, Belgium, and government recommendations for reduced consumption of meat, such as seen in Sweden, are becoming increasingly popular and could reduce N emissions. Attendees at the workshop signed the ‘Barsac declaration’ (<http://www.nine-esf.org/barsac-declaration>) to reduce meat consumption encourage the availability of reduced meat portions.

Another suggestion proposed at the workshop was promoting grass-fed animals over housed ones, which generate higher ammonia emissions. The latter option has benefits for consumer health (e.g. Daley and others, 2010), animal welfare and the management of the grasslands, since biomass is removed by grazing, but means that emissions cannot be managed by filtering N compounds from the air. “Green meat” (meat produced on high value grasslands) provides a further benefit of ensuring that grasslands of high value for nature conservation remain agriculturally productive and economically viable. A further option is to take measures to reduce population growth.

Policy questions for research

Results of study and personal observations have convinced policy makers and scientists from a range of countries and backgrounds at the workshop that N deposition is having an impact on species-rich acid grasslands in the Atlantic biogeographic region of Europe. However, there remain some important questions that require attention from

scientists and policy makers in order for progress to be made toward providing greater protection for sensitive habitats.

What changes are of conservation concern?

The evidence, briefly summarized above, shows a wide range of impacts on vegetation and soils, but there is a need to determine which of these changes are of conservation concern. For example, it may be that while changes in chemistry of plant tissues on a gradient of N deposition have the potential to provide an early warning of plant stress (Gidman and others 2006), it is likely to be of less concern in terms of the assessment and management of sites of conservation importance than changes in community structure and function. A reduction in plant species richness or a change in community composition may be of much greater concern, because it represents a loss of biodiversity. Of the changes that are considered of conservation concern in a particular habitat, it is necessary to determine which of these changes are the most important and which should trigger the need for action.

How much change is necessary for it to be considered significant?

Once important changes have been identified, the magnitude of these changes needs to be considered. For example, Stevens and others (2004), in a gradient survey of acid grasslands in Great Britain, reported an average reduction in species richness of one species for every additional 2.5 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ and suggested that this pattern was the result of long-term elevated N deposition. Given a response curve such as this, it is up to scientists and policy makers to determine 'acceptable' changes in community composition or reductions in species abundance or biodiversity before taking action. The dependence of ecosystem services on species diversity is a rapidly advancing research front (e.g. Engelhardt and Ritchie 2001) and will inform the extent to which species loss can be tolerated.

Addressing these questions will require close collaboration between scientists and policy makers and will provide a future direction for N-deposition research.

Acknowledgements

This project was funded by the European Science Foundation through the EURODIVERSITY-programme, and national funds were provided by DfG (Germany), NERC (United Kingdom), NWO (The Netherlands) and INRA, ADEME and Aquitaine Region (France). We are grateful to workshop participants for their useful contributions.

References

Achermann B, Bobbink R (2003) Empirical Critical Loads for Nitrogen, Proceedings of the Expert Workshop, Berne, 11–13 November 2002. Swiss Department for the Environment, Forests and Landscape, Berne.

- Asman WAH, van Jaarsveld JA (2002) A variable-resolution transport model applied for NH_x in Europe. *Atmospheric Environment* 26A:445-464.
- Blake L, Goulding KWT, Mott CJB, Johnston AE (1999) Changes in soil chemistry accompanying acidification over more than 100 years under woodland and grass at Rothamstead Experimental Station, UK. *European Journal of Soil Science* 50:401-412.
- Bleeker A, Hicks WK, Dentener F, Galloway J, Erisman JW (in press) N deposition as a threat to the World's protected areas under the Convention on Biological Diversity. *Environmental Pollution*.
- Bobbink R, Hornung M, Roelofs JGM (1998) The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology* 86:717-738.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, Spranger T, Alkemade R, Ashmore M, Bustamante M, Cinderby S, Davidson E, Dentener F, Emmett B, Erisman JW, Fenn M, Gilliam F, Nordin A, Pardo L, De Vries W (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications* 20:30-59.
- Buisson E, Holl KD, Anderson S, Corcket E, Hayes GF, Torre F, Peteers A, Dutoit T (2006) Effect of seed source, topsoil removal, and plant neighbour removal on restoring California coastal prairies. *Restoration Ecology* 14:569-577.
- Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S (2010) A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal* 9:1-12.
- De Graaf MCC, Verbeek PJM, Bobbink R, Roelofs JGM (1998) Restoration of species-rich dry heaths. The importance of appropriate soil conditions. *Acta Botanica Neerlandica* 47:98-111.
- Dentener F, Drevet J, Lamarque JF, Bey I, Eickout B, Fiore AM, Hauglustaine D, Horowitz LW, Krol M, Kulshrestha UC, Lawrence M, Galy-Lacaux C, Rast S, Shindell D, Stevenson D, Van Noije T, Atherton C, Bell N, Bergman D, Butler T, Cofala J, Collins B, Doherty R, Ellingsen K, Galloway J, Gauss M, Montanaro V, Müller JF, Pitari G, Rodriguez J, Sanderson M, Solomon F, Strahan S, Schultz M, Sudo K, Szopa S, Wild O (2006) Nitrogen and sulfur deposition on regional and global scales: A multimodel evaluation. *Global Biogeochemical Cycles* 20:1-21.
- Dorland E, Hart MAC, Vermeer ML, Bobbink R (2005a) Assessing the success of wet heath restoration by combined sod cutting and liming. *Applied Vegetation Science* 8:209-311.
- Dorland E, van den Berg LJJ, Brouwer E, Roelofs JGM, Bobbink R (2005b) Catchment liming to restore degraded, acidified heathlands and moorland pools. *Restoration Ecology* 13:302-311
- Dorland E, Van den Berg LJJ, Van den Berg AJ, Vermeer M, Roelofs JGM, Bobbink R (2004) The effects of sod cutting and additional liming on potential net nitrification in heathland soils. *Plant and Soil* 265:267-277.
- Duprè C, Stevens CJ, Ranke T, Bleeker A, Peppeler-Lisbach C, Gowing DJG, Dise NB, Dorland E, Bobbink R, Diekmann M (2010) Changes in species richness and composition

- in European acidic grasslands over the past 70 years: the contribution of cumulative atmospheric nitrogen deposition. *Global Change Biology* 16:344-357.
- EEA (2007) Halting the loss of biodiversity by 2010: proposal for a first set of indicators to monitor progress in Europe. European Environment Agency, Copenhagen.
- EEA (2008) Article 17 database <http://biodiversity.eionet.europa.eu/article17/chapter9>.
- Ellenberg H (1996) *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*, 5th edn. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Engelhardt KM, Ritchie ME (2001) Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. *Nature* 411:687-689.
- Erismann JW, Bleeker A, Hensen A, Vermeulen A (2008) Agricultural air quality in Europe and the future perspectives. *Atmospheric Environment* 42:3209-3217.
- Eschen R, Mortimer SM, Lawson CS, Edwards AR, Brook AJ, Igual JM, Hedlund K, Schaffner U (2007) Carbon addition alters vegetation composition on ex-arable fields. *Journal of Applied Ecology* 44:95-104.
- European Commission (2006) Assessment, monitoring and reporting under Article 17 of the Habitats Directive: explanatory notes and guidelines, European Commission.
- Fagerli H, Aas W (2008) Trends of nitrogen in air and precipitation: Model results and observations at EMEP sites in Europe, 1980-2003. *Environmental Pollution* 154:448-461.
- Falkengren-Grerup U (1995) Long-term changes in flora and vegetation in deciduous forests of southern Sweden. *Ecological Bulletins* 44:215-226.
- Fowler D, Smith R, Muller J, Cape JN, Sutton M, Erismann JW, Fagerli H (2007) Long term trends in sulfur and nitrogen deposition in Europe and the cause of non-linearities. *Water Air and Soil Pollution Focus* 7:41-47.
- Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA (2008) Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320:889-892.
- Galvnek D, Jank M (2008) Management of Natura 2000 habitats. 6230 *Species-rich *Nardus* grasslands. European Commission.
- Gauger T, Anshelm F, Schuster H, Erismann JW, Vermeulen AT, Draaijers GPJ, Bleeker A, Nagel H-D, (2002) Mapping of ecosystem specific long-term trends in deposition loads and concentrations of air pollutants in Germany and their comparison with Critical Loads and Critical Levels. Institut fur Navigation, University of Stuttgart, Germany.
- Gidman EA, Stevens CJ, Goodacre R, Broadhurst D, Emmett B, Gwynn-Jones D (2006) Loss of forb diversity in relation to nitrogen deposition in the UK: regional trends and potential controls. *Global Change Biology* 12:1823-1833.
- Hautier Y, Niklaus PA, Hector A (2009) Competition for Light Causes Plant Biodiversity Loss After Eutrophication. *Science* 324: 636-638.
- Hejcman M, Schellberg J, Pavl V (2010) Long-term effects of cutting frequency and liming on soil chemical properties, biomass production and plant species composition of *Lolio-Cynosuretum* grassland after the cessation of fertilizer application. *Applied Vegetation Science* 13:257-269.

- Hejcman M, Klaudivová M, Hejcmanová P, Pavlů V, Jones M (2009) Expansion of *Calamagrostis villosa* in sub-alpine *Nardus stricta* grassland: Cessation of cutting management or high nitrogen deposition? *Agriculture Ecosystems and Environment* 129:91-96.
- ICP Modelling and Mapping (2004) Manual on Methodologies and Criteria for Mapping Critical Levels/Loads and geographical areas where they are exceeded. Report UBA-Texte 52/04, <http://icpmapping.org/>.
- Jansen AJM, Roelofs JGM (1996) Restoration of *Cirsio-Molinietum* wet meadows by sod cutting. *Ecological Engineering* 7:279-298.
- Johnston AE, Goulding KWT, Poulton PR (1986) Soil acidification during more than 100 years under permanent grassland and woodland at Rothamstead. *Soil Use and Management* 2:3-10.
- Jones AT, Hayes MJ (1999) Increasing floristic diversity in grassland: the effects of management regime and provenance on species introduction. *Biological Conservation* 87:381-390.
- Krahulec F (1985) The Chorologic Pattern of European *Nardus*-Rich Communities. *Vegetatio* 59:119-123.
- Mace G, Masundire H, Baille J, (2005) Biodiversity, Millenium Ecosystem Assessment. Island Press, Washington.
- Maskell LC, Smart SM, Bullock JM, Thompson K, Stevens CJ (2010) Nitrogen Deposition causes widespread species loss in British Habitats. *Global Change Biology* 16:671-679.
- NEG-TAP (2001) Transboundary air pollution: Acidification, eutrophication and ground-level ozone in the UK. CEH, Edinburgh.
- Netherlands Environmental Assessment Agency (2005) Environmental data compendium: Nitrogen deposition in the Netherlands, 2001. <http://www.mnp.nl/mnc/i-en-0189.html>.
- Nilsson J, Grennfelt PE, (1988) Critical Loads for sulphur and nitrogen. UNECE/Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark.
- Oloff H, Bakker JP (1991) Long-term dynamics of standing crop and species composition after the cessation of fertiliser application to mown grassland. *Journal of Applied Ecology* 28:1040-1052.
- Pieterse G, Bleeker A, Vermeulen AT, Wu Y, Erisman JW (2007) High resolution modelling of atmosphere-canopy exchange of acidifying and eutrophying components and carbon dioxide for European forests. *Tellus* 59B:412-424.
- Poschlod P, Biewer H (2005) Diaspore. and gap availability are limiting species richness in wet meadows. *Folia Geobotanica* 40:13-34
- Pywell RF, Bullock JM, Hopkins A, Walker KJ, Sparks T, Burke MJW, Peel S (2002) Restoration of species-rich grassland on arable land: assessing the limiting processes using a multi-site experiment. *Journal of Applied Ecology* 39:294-309.
- Roelofs JGM, Bobbink R, Brouwer E, De Graaf MCC (1996) Restoration ecology of aquatic and terrestrial vegetation on non-calcareous sandy soils in The Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica* 45:517-541.

- Rosegrant MW, Leach N, Gerpacio RV (1999) Alternative futures for world cereal and meat consumption. *Proceedings of the Nutrition Society* 58:219-234.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH (2000) Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1774.
- Schwickerath M (1944) Das Hohe Venn und seine Randgebiete. *Pflanzensoziologie* 6:1-278.
- Sikor T (2003) The commons in transition: Agrarian and environmental change in Central and Eastern Europe. *Environmental Management* 34:270-280.
- Silvertown J, Dodd ME, McConway K, Potts J, Crawley M (1994) Rainfall, biomass variation, and community composition in the Park Grass Experiment. *Ecology* 75:2430-2437.
- Smith RI, Fowler D, Sutton MA, Flechard C, Coyle M (2000) Regional estimation of pollutant gas dry deposition in the UK: model description, sensitivity analyses and outputs. *Atmospheric Environment* 34:3757-3777.
- Soons MB, Messelink JH, Jongejans E, Heil GW (2005) Habitat fragmentation reduces grassland connectivity for both short-distance and long-distance wind-dispersed forbs. *Journal of Ecology* 93:1214-1225.
- Stevens CJ, Dise NB, Mountford JO, Gowing DJ (2004) Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science* 303:1876-1879.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, Gaudnik C, Gowing DJG, Bleeker A, Diekmann M, Alard D, Bobbink R, Fowler D, Corcket E, Mountford JO, Vandvik V, Aarrestad PA, Muller S, Dise NB (2010a) Nitrogen deposition threatens species richness of grasslands across Europe. *Environmental Pollution* 158:2940-2945.
- Stevens CJ, Duprè C, Dorland E, Gaudnik C, Gowing DJG, Bleeker A, Diekmann M, Alard D, Bobbink R, Fowler D, Corcket E, Mountford JO, Vandvik V, Aarrestad PA, Muller S, Dise NB (In press) The impact of nitrogen deposition on acid grasslands in the Atlantic region of Europe. *Environmental Pollution*.
- Stevens CJ, Dupre C, Gaudnik C, Dorland E, Dise NB, Gowing DJ, Bleeker A, Alard D, Bobbink R, Fowler D, Corcket E, Vandvik V, Mountford JO, Aarrestad PA, Muller S, Diekmann M (2011) Changes in species composition of European acid grasslands observed along a gradient of nitrogen deposition. *Journal of Vegetation Science* 22:207-215.
- Stevens CJ, Maskell LC, Smart SM, Caporn SJM, Dise NB, Gowing DJ (2009) Identifying indicators of atmospheric nitrogen deposition impacts in acid grasslands. *Biological Conservation* 142:2069-2075.
- Stevens CJ, Thompson K, Grime JP, Long CJ, Gowing DJG (2010b) Contribution of acidification and eutrophication to declines in species richness of calcifuge grasslands along a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Functional Ecology* 24:478-484.
- ter Braak CFJ, Smilauer P, (2002) CANOCO 4.5, 4.5 ed. Biometris, Wageningen.

- Tilman D (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5995-6000.
- Tyler G, Olsson T (2001) Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to soil acidity. *European Journal of Soil Science* 52:151-165.
- Török K, Szili-Kovacs T, Halassy M, Toth T, Hayek Z, Paschke MW, Wardell LJ (2000) Immobilization of Soil Nitrogen as a Possible Method for the Restoration of Sandy Grassland. *Applied Vegetation Science* 3:7-14.
- van den Berg LJJ, Dorland E, Vergeer P, Hart MAC, Bobbink R, Roelofs JGM (2003a) Decline of acid-sensitive plant species in heathland can be attributed to ammonium toxicity in combination with low pH. *New Phytologist* 166:551-564.
- van den Berg LJJ, Vergeer P, Roelofs JGM (2003b) Heathland restoration in The Netherlands: Effects of turf cutting depth on germination of *Arnica montana*. *Applied Vegetation Science* 6:117-124.
- Van Jaarsveld JA (1995) Modelling the long-term atmospheric behaviour of pollutants on various spatial scales. University of Utrecht, The Netherlands.
- Van Jaarsveld JA (2004) The operation priority substances model. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- Walker KJ, Stevens PA, Stevens DP, Mountford JO, Manchester SJ, Pywell RF (2003) The restoration and re-creation of species rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. *Biological Conservation* 119:1-18.
- Wilson EJ, Wells TCE, Sparks TH (1995) Are calcareous grasslands in the UK under threat from nitrogen deposition? - an experimental determination of a critical load. *Journal of Ecology* 83:823-832.