

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse  
Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie per  
l'Ambiente e il Territorio

Impatto del pascolamento bovino sulla  
comunità microbica del suolo d'interesse per il  
ciclo dell'azoto

Relatore  
Prof. Andrea Squartini  
Correlatore  
Prof. Enrico Sturaro

Laureando  
Salvatore  
Raniolo  
Matricola n.  
1157152

ANNO ACCADEMICO 2017/2018







## Sommario

Abstract.....	3
Introduzione .....	5
Ciclo dell'Azoto: concetti generali per gli ecosistemi terrestri .....	7
Microrganismi: Archea e Bacteria, concetti generali .....	13
Archea e Bacteria d'interesse alla nitrificazione e denitrificazione .....	17
Geni <i>amoA</i> e <i>nosZ</i> : concetti generali .....	19
Pascolamento e Pascoli.....	22
Pascolamento e Pascoli: concetti generale.....	22
Pascolamento: impatti principali sugli ecosistemi terrestri .....	28
Principali razze allevate delle aree di studio.....	33
Materiali e Metodi .....	37
Siti di Indagine.....	37
Siti Nepalesi.....	38
Sito: pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" .....	41
Sito: pascolo di Malga Ombretta .....	42
Sito: pascolo di Malga Juribello .....	44
Procedure di Campionamento, Estrazione, Purificazione e Amplificazione del DNA del suolo .....	46
Risultati e Discussione.....	51
Conclusioni .....	89
Bibliografia .....	93
Ringraziamenti.....	101
Allegati.....	105



## Abstract

Il seguente lavoro cerca di investigare il possibile impatto del pascolamento di vacche da latte sulla comunità microbica del suolo, legata al ciclo dell'azoto. Al fine di valutare l'impatto sulla biodiversità microbica funzionale degli ecosistemi prativi si sono condotte indagini tramite carotaggi di topsoil in due pascoli montani durante il periodo di monticazione e in assenza di carico bovino. Sono stati inoltre campionati suoli di altre tre aree diverse, ma in un unico periodo, per avere ulteriori confronti così da rendere l'analisi più robusta. Si è applicato un approccio ecologico molecolare, analizzando le comunità microbiche in termini di abbondanze relative alle copie di geni target attraverso l'applicazione della real-time PCR. I geni studiati sono stati il *nosZ* per la denitrificazione, l'*amoA Archea* e *bacteria* per la nitrificazione. Per i due pascoli alpini si è inoltre analizzato il rapporto tra il gene *amoA Archea* su quello *bacteria*. L'analisi ha evidenziato differenti esiti tra le aree considerate, rivelando un verosimile impatto del pascolamento sulle comunità microbiche ma in termini diversi a seconda delle condizioni pedoclimatiche e vegetazionali locali e dei carichi bovini.

The following work investigates the possible impact of grazing dairy cattle on the microbial community of the soil, linked to the nitrogen cycle. In order to assess the impact on the functional microbial biodiversity of the grazing ecosystems, surveys were carried out using topsoil cores in two mountain pastures during the montication period and in the absence of a cattle load. We also sampled soils in three different areas, but in a single period, to have further comparisons to make the analysis more robust. A molecular ecological approach was applied, analyzing microbial communities in terms of abundances relative to copies of target genes through the application of real-time PCR. The studied genes were *nosZ* for denitrification, *amoA Archea* and *Bacteria* for nitrification. For the two alpine pastures, the relationship between the *amoA Archea* gene and the *Bacteria* gene was also analyzed. The analysis highlighted different outcomes between the considered areas, showing a likely impact of grazing on microbial communities but in different terms depending on the local pedoclimatic and vegetational conditions and the cattle loads.



## Introduzione

Comprendere le interazioni ecologiche tra microrganismi, produttori primari e consumatori primari negli ecosistemi prativi è il fulcro di questo lavoro. Con questo studio si cerca di valutare l'impatto del pascolamento di animali, allevati in aree montane, sulle comunità microbiche del suolo, funzionali al ciclo dell'azoto. La comprensione della complessa rete alla base degli ecosistemi, sia naturali che seminaturali, permette una caratterizzazione chiara dei possibili impatti antropici attuali, sia in termini quantitativi che qualitativi. Una chiara caratterizzazione è la base per lo sviluppo sia di strumenti per il loro monitoraggio, come indici, che di programmi di gestione volti alla miglior conservazione del patrimonio naturale. In questa ottica con il seguente lavoro di tesi si è cercato di approfondire la conoscenza a livello microbiologico dei pascoli, specie quelli montani. Questi sono ecosistemi semi-naturali estremamente importanti per la biodiversità e strettamente legati al settore zootecnico. Si è cercato così di valutare l'impatto del settore zootecnico sulle praterie pascolate di alta quota, considerando nello specifico il pascolamento delle vacche da latte. Valutare l'impatto del pascolamento ha importanti implicazioni nella gestione e valorizzazione degli allevamenti, specie per quelli montani. Queste realtà sono fortemente legate alle realtà umane, pertanto delinearne le esternalità positive e negative è la base per la corretta gestione e conservazione sostenibile degli interi ecosistemi locali. L'approccio usato per lo studio è stato di tipo molecolare in quanto si è caratterizzata parte della biodiversità funzionale di questi ecosistemi con analisi del DNA presente nel suolo. La parte di biodiversità funzionale studiata riguarda nello specifico i microrganismi responsabili per la nitrificazione e la denitrificazione, quindi legati al ciclo dell'azoto, attraverso i due geni *amoA* e *nosZ*. L'approccio molecolare si è basato sulla tecnica della real-time PCR, che ha permesso una descrizione della biodiversità funzionale in termini di abbondanza intesa come copie dei geni selezionati presenti. I due geni quindi sono stati utilizzati come indicatori molecolari per valutare se la nitrificazione, la denitrificazione e la comunità microbica sono influenzabili dal pascolamento, inteso come disturbo biotico del sistema.

La scelta di approfondire parte della biodiversità funzionale dei pascoli legata al ciclo dell'azoto risiede nel ruolo importante di questo elemento all'interno degli ecosistemi e per i cambiamenti climatici in atto. Attualmente si conosce ancora poco sull'impatto del pascolamento riguardo la biodiversità, specie quella funzionale e

microbiologica. Questo è dovuto al fatto che solo recentemente è stata sviluppata la strumentazione analitica, ma mancano ancora protocolli standard internazionali d'indagine. La conoscenza riguardo la biodiversità microbica e i suoi ruoli a livello ecosistemico è alla base di una completa descrizione degli ecosistemi. Valutare gli impatti dell'operato antropico sulla componente microbica quindi è da considerarsi prioritario nell'ottica di uno sviluppo ambientale il più sostenibile possibile. Tuttavia, per una corretta valutazione occorrerebbe considerare molteplici variabili ambientali, che rendono complesso tutto l'operato. A fronte di ciò il seguente lavoro di tesi appare inevitabilmente avere dei limiti in quanto non è stato possibile raccogliere tutte le informazioni riguardo le numerose variabili ambientali per delineare al meglio il contesto operativo. Condurre studi simili richiederebbe quindi molteplici competenze e maggior tempo al fine di profilare con maggior accuratezza le interazioni, le cause e gli effetti considerati attraverso l'analisi anche di serie storiche.

Per condurre un'indagine statisticamente robusta si sono selezionate diverse aree, tra loro indipendenti. Le aree studiate comprendono due pascoli italiani di montagna e uno di pianura, ma anche siti nepalesi grazie alla frequentazione di un'International Winter School durante il periodo di tesi. Per i due pascoli montani è stata condotta l'indagine in due distinti periodi e condizioni, considerando poi nell'analisi la dipendenza spaziale. Questo per tentare di valutare nello specifico l'effetto del pascolamento bovino sulla comunità microbica funzionale dei pascoli.

La tesi si articola in tre parti: l'introduzione, la metodica e l'analisi dati con la conclusione. L'introduzione è volta a delineare in maniera concisa il contesto operativo. Si parte quindi con una breve descrizione del ciclo dell'azoto in termini di processi, attori e loro interazioni negli ecosistemi terrestri. A questa segue una descrizione più approfondita dei principali microrganismi studiati, gli Archea e i Batteri, e dei tre geni utilizzati come indicatori con anche un breve excursus sul suolo, la matrice ambientale di indagine. Successivamente si introducono la realtà del pascolo montano dal punto di vista ecologico con accenni alla sostenibilità e l'impatto ambientale del settore zootecnico, le principali razze di vacche incontrate nello studio e il pascolamento con i suoi impatti sull'ecosistema prativo. Finita la parte introduttiva si introducono le metodiche usate per le indagini e delle brevi descrizioni sui siti coinvolti, per poi terminare con l'analisi dei dati e le conclusioni.

## Ciclo dell'Azoto: concetti generali per gli ecosistemi

### terrestri

L'Azoto (N) è un componente essenziale per ogni organismo vivente come costituente degli acidi nucleici e amminoacidi. In natura è un elemento con ben 8 valenze:  $\pm 1, \pm 2, \pm 3, 0$  e  $+5$ ; questo gli consente di essere presente sotto forma di numerosi composti sia organici che inorganici molto diffusi. È il principale nutriente limitante per la vita terrestre, nonostante sia l'elemento più abbondante in atmosfera come azoto molecolare ( $N_2$ ) con una presenza del 78%. Questo elemento si ritrova in natura anche nelle rocce, da cui può essere estratto grazie all'attività di microrganismi ed immesso nelle catene trofiche degli ecosistemi (Houlton et al., 2018). Il ciclo biogeochimico dell'azoto è attualmente compromesso dall'attività antropica, che ha drasticamente incrementato gli apporti azotati globali attraverso deposizioni, specie nei paesaggi urbani e agricoli (Houlton et al., 2018). Il ciclo biogeochimico di questo elemento è caratterizzato principalmente da 6 processi, che vedono coinvolte numerose specie tra i microrganismi. Essi sono: l'assimilazione, l'ammonificazione, la nitrificazione, la denitrificazione, l'ossidazione anaerobica dell'ammonio (anammox) e la fissazione dell'azoto. La maggior parte di questi processi è attuata da microrganismi grazie a reazioni enzimatiche, che dipendono da variabili ambientali, come la temperatura, la presenza di ossigeno, l'umidità e soprattutto il pH. Per esempio, valori di pH molto bassi, quindi condizioni acide, possono sfavorire o addirittura inibire l'attività batterica. A livello globale il ciclo avviene con le stesse modalità di quello locale, variando quindi solo nella scala.

L'azoto molecolare, la forma più diffusa, non è direttamente utilizzabile dagli organismi che lo possono assimilare solo come ammonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ). L'elemento entra negli ecosistemi, nelle loro reti trofiche, attraverso due modalità: la prima è la deposizione atmosferica come nitrato sia umida, con piogge, nevi e nebbie, che secca, con aerosol e particolato; la seconda modalità è la fissazione dell'azoto atmosferico, che avviene a sua volta in due modalità. La prima vede il coinvolgimento di elevate quantità di energia, erogate per esempio da fulmini, necessarie per far reagire l'azoto molecolare con l'ossigeno e l'idrogeno delle molecole d'acqua per produrre nitrati e ammonio depositabili con le piogge. Queste reazioni sono endotermiche ed endoergoniche, quindi non spontanee a temperatura ambiente e proprio per tale motivo richiedono ingenti quantità di energia. L'altra modalità è la fissazione biologica, cioè una

reazione di riduzione operata grazie all'enzima nitrogenasi di specifici microrganismi. Questo enzima è capace di operare in assenza di ossigeno molecolare ( $O_2$ ), pertanto gli azotofissatori all'interno dei noduli radicali richiedono un ambiente anaerobio per fissare l'azoto. La nitrogenasi scinde l'azoto molecolare in due atomi e successivamente introduce l'idrogeno proveniente dall'acqua per formare una molecola di ammonio. Esistono tre differenti tipi di nitrogenasi, che si distinguono in base al tipo di metallo presente nel centro di reazione. I tre metalli presenti sono il Ferro, il Vanadio e il Molibdeno. Tra questi il Vanadio è quello solitamente più diffuso, mentre gli altri due tendono a essere rari nelle forme biodisponibili, pertanto possono limitare la fissione dell'azoto in determinati tipi di ecosistemi (Kuypers et al., 2018). In natura sono note numerose specie capaci di fissare l'azoto, comprendendo microrganismi simbiotici nell'apparato radicale delle piante e a vita libera. Nel caso dei simbiotici con le piante, l'azotofissazione risulta essere una reazione molto costosa, che richiede 10 g di glucosio per la fissazione di 1 g di azoto da parte degli azotofissatori. I batteri simbiotici, responsabili della fissazione dell'azoto, appartengono per lo più al genere *Rhizobium* e per la maggior parte sono associati alla famiglia delle leguminose. Essi risiedono nell'apparato radicale in specifiche regioni: i noduli, che forniscono l'ambiente anossico favorevole alla nitrogenasi. Questi si sviluppano grazie all'interazione tra microrganismi e pianta. L'adesione all'apice dei peli radicali dei rizobi, intesi come qualsiasi specie batterica capace di indurre la nodulazione, corrisponde all'innesco della genesi dei noduli. I batteri sono richiamati dalla pianta attraverso il rilascio dai peli radicali dei flavonoidi, dei metaboliti secondari. L'adesione batterica porta all'induzione dei geni di nodulazione (*nod*) con la successiva sintesi di molecole batteriche chiamate fattori Nod. Queste molecole attivano a cascata una serie di espressioni genetiche della pianta finalizzate alla formazione dei noduli. L'invasione dei rizobi nei peli radicali e nelle adiacenti cellule corticali avviene attraverso i fili di infezione. Un singolo pelo radicale può presentare più fili di infezione con diverse specie di rizobi. Le cellule corticali adiacenti iniziano a dividersi sviluppando il primordio di nodulo, che ospita i rizobi introdotti dal filo d'infezione. All'interno del primordio di nodulo i rizobi si dividono, sviluppandosi in batteroidi capaci di fissare l'azoto molecolare. La comparsa dei batteroidi corrisponde al reale inizio della simbiosi tra pianta e microrganismi. La proliferazione dei batteroidi nei primordi porta alla formazione dei noduli. Il nodulo insieme ai batteroidi corrispondono

al simbiosoma. Nel nodulo la concentrazione di ossigeno è regolata dal gruppo eme della leg-emoglobina, presente in elevate concentrazioni nel citosol delle cellule infettate. La leg-emoglobina permette la respirazione nei noduli senza l'inibizione della nitrogenasi da parte dell'ossigeno. I rizobi possono essere presenti non solo nei noduli. Essi si possono diffondere come microsimbioniti dalle radici ai fusti e foglie attraverso i vasi xilematici e il sistema floematico, diventando endofiti. Gli endofiti sono batteri capaci di vivere negli spazi intercellulari nei sistemi di trasporto vegetali, senza però invadere internamente le cellule vive (Baldan et al., 2014). Gli endofiti nodulari (quali i rizobi o l'attinomicete *Frankia*) sono capaci di fissare l'azoto, riuscendo a sostenere il fabbisogno delle piante per questo nutriente. Tra i batteri a vita libera nel suolo contribuiscono al processo svariati generi, come gli *Azotobacter*, aerobi, e il *Clostridium*, anaerobio. Anche i cianobatteri, microrganismi non simbiotici, sono capaci di fissare l'azoto come epifiti sia in ambienti acquatici che in quelli terrestri. Il genere di cianobatteri fissatori *Nostoc* sp. vive principalmente come epifita del muschio *Pleurozium schreberi* e costituisce la principale fonte di azoto negli ecosistemi forestali boreali. Infine, vi sono alcuni esempi di specie tra i licheni, come il *Collema tunaeforme* e il *Peltigera rufescens*, che presentano tra i simbiotici cianobatteri fissatori di azoto.

Alcuni microrganismi attuano la nitrificazione: l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrati e nitriti. La nitrificazione avviene in due distinte fasi: l'ossidazione da ammonio a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e quella da nitrito a nitrato. Questi processi sono esoergonici e l'energia rilasciata è usata dai batteri autotrofi chemiosintetici per ridurre l'anidride carbonica, producendo monomeri organici. Raramente una singola specie riesce ad attuare entrambe le fasi, quindi è molto frequente che queste vengano attuate da specie distinte. I batteri *Nitrosomonas* ossidano l'ammonio a nitrito, mentre i *Nitrobacter* ossidano il nitrito a nitrato. Il nitrato prodotto può essere assorbito attraverso le radici e assimilato tramite la via della glutammina sintetasi-glutammato sintasi dalle piante o può essere lisciviato se in quantità eccessive o, in condizioni anaerobiche, essere usato come accettore di elettroni da altri microrganismi. Questa ultima circostanza corrisponde alla denitrificazione, ossia la riduzione dei nitrati ad azoto molecolare o a protossido d'azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ), entrambe specie gassose. Il protossido risulta essere uno tra i gas serra con il più alto potenziale di riscaldamento climatico, pari a circa 310 volte quello dell'anidride carbonica. La denitrificazione, tipica di ambienti anossici, è attuata da batteri come gli *Pseudomonas*.

È un processo che può instaurarsi con stagionalità in funzione delle precipitazioni o di disturbi come la compattazione del suolo ed è comune negli ecosistemi umidi e in quelli acquatici lenticì, specie tra gli ambienti bentonici di questi. Il nitrato, un anione, è la specie di azoto più facilmente trasportabile dagli ecosistemi terrestri a quelli acquatici in quanto suscettibile di lisciviazione per effetto delle percolazioni dell'acqua. Pertanto, la sua abbondanza ha un ruolo molto rilevante poiché può innescare fenomeni di eutrofizzazione. Questo si esplica negli ambienti acquatici con la proliferazione algale grazie all'abbondanza dei nutrienti, a cui segue dopo la moria un incremento dell'attività batterica per la decomposizione. Questa attività di decomposizione comporta un uso eccessivo di ossigeno, che rende asfittico l'ambiente acquatico con la conseguente riduzione del biota. Negli ecosistemi terrestri invece l'eutrofizzazione si esplica con l'eccessiva espansione delle popolazioni di specie nitrofile e graminacee con la conseguente perdita di biodiversità floristica.

L'ammonificazione consiste nella demolizione degli amminoacidi da parte dei decompositori con la conseguente produzione di ammonio ed avviene nel suolo. L'ammonio prodotto da questo processo, in realtà, deriva dalla rapida reazione tra gli ioni  $H^+$  presenti nel suolo e l'ammoniaca ( $NH_3$ ), prodotta dalle reazioni metaboliche dei microrganismi. L'ammoniaca, tuttavia, può essere introdotta indirettamente anche attraverso le deiezioni animali. I suoli lievemente acidi, quelli con un eccesso di ioni  $H^+$ , favoriscono l'ammonificazione. In assenza di protoni disponibili, l'ammoniaca risulta essere un gas facilmente volatile, quindi in suoli neutri e basici essa può trasferirsi direttamente in atmosfera, dove svolge un ruolo importante nella neutralizzazione delle piogge acide come base. L'ammonio viene introdotto nell'ecosistema non solamente attraverso l'ammonificazione, ma anche per mezzo delle deposizioni atmosferiche. Esso è direttamente assimilabile dalle piante, ma anche oggetto di trasformazione da alcune specie di microrganismi aerobi nitrificanti. Questo porta a una competizione tra piante e microrganismi nel suolo. Tra quest'ultimi vi sono batteri come i *Nitrosomonas* e i *Nitrobacter*, ma anche specie appartenenti al dominio degli Archea.

La relazione tra microrganismi liberi e piante per l'azoto negli ecosistemi terrestri ha un ruolo fondamentale poiché permette l'introduzione dell'elemento nella catena trofica attraverso forme organiche assimilabili. Queste relazioni si svolgono prevalentemente nel suolo e coinvolgono specie sia microrganismi nitrificanti che

denitrificanti, ma risulta essere definita nel tempo. La biosintesi vegetale di essudati radicali e la decomposizione dei peli radicali incrementano nella rizosfera il carbonio organico, che è velocemente utilizzato dai microrganismi come substrato di crescita. Alcuni essudati radicali attivano l'attività microbica e la presenza di carbonio organico disponibile permette ai batteri di immobilizzare l'azoto tramite reazione enzimatiche, andando così a incrementare la disponibilità di questo nutriente per le piante. Il consumo rapido del SOM comporta un arresto dell'attività batterica, sia della crescita che dell'immobilizzazione dell'azoto. In scarsa presenza di azoto, durante per esempio la crescita radicale, i microrganismi possono produrre enzimi extracellulari per ottenere il nutriente dalla matrice pedologica, specie dal carbonio organico (SOM) attraverso la sua mineralizzazione e l'estrazione di aminoacidi. A questo evento segue l'ammonificazione con il rilascio quindi di ammonio come metabolita secondario. Il flusso di azoto guidato dalla competizione iniziale tra piante, attraverso le radici, e microrganismi è direzionato verso le prime. Infatti, la parziale morte della comunità microbica nella rizosfera incrementa ulteriormente l'azoto disponibile per le piante, che lo possono utilizzare per la biosintesi di nuovi tessuti e metaboliti, sia primari che secondari, andando così a ripristinare il ciclo. Nel breve tempo quindi i microrganismi prevalgono nella competizione con le piante per l'uso di azoto. Questo riduce localmente la perdita di azoto a causa della sua limitata capacità di assorbimento delle radici. Nel lungo termine, tuttavia, le radici causano una deplezione di azoto nella rizosfera con un suo continuo assorbimento, variando il rapporto C/N con conseguenze per le comunità di microrganismi. Nel primo e nel breve periodo prevale l'assorbimento dei microrganismi, mentre nel secondo e lungo periodo quello delle piante. L'iniziale competizione infatti previene la perdita in ambiente dell'azoto e le piante sono in grado di supportare i microrganismi, impegnati nell'immobilizzazione del nutriente, attraverso la loro attività fotosintetica, convertita in essudati radicali. In questo modo la competizione assume le caratteristiche di una cooperazione. La competizione temporale in una visione d'insieme risulta essere una relazione mutualistica, specie negli ecosistemi dove l'azoto è limitato, come le praterie alpine. La competizione interspecifica tra popolazioni vegetali in una prateria può probabilmente incrementare la selezione per i microrganismi legati alla rizosfera, promuovendo il mutualismo attraverso la selezione. Questo porterebbe a massimizzare nel tempo l'azoto disponibile per la pianta. La densità dell'apparato

radicale è un fattore chiave nel partizionamento dell'azoto disponibile tra piante e microrganismi. Le radici solitamente occupano la parte superiore del suolo, dove si concentra una maggior quantità di carbonio disponibile utilizzabile per l'immobilizzazione dell'azoto. L'intensità dello sviluppo della rizosfera quindi influenza direttamente il rapporto tra piante e microrganismi. Questo rapporto varia nel tempo e il ciclo fenologico delle piante, insieme al clima locale, possono spiegarne la variazione. I fattori capaci di influenzare l'assorbimento idrico delle radici governano anche quello dell'azoto. Il tasso di traspirazione insieme all'intensità dell'attività fotosintetica, alla temperatura, all'umidità del suolo, al deficit di acqua e alla velocità del vento influenzano la capacità di assorbimento dei nutrienti per le piante. L'attività microbica per converso è ridotta a basse temperature e influenzata dall'umidità del suolo. Il pH invece varia la disponibilità dei nutrienti e può alterare le funzioni di alcuni trasportatori collocati sulle radici e la speciazione delle comunità microbiche. Appare chiaro quindi che la relazione tra piante e microrganismi è governata sia da fattori biotici che abiotici ed è fondamentale nel ciclo dell'azoto negli ecosistemi terrestri ( Kuzyakov e Xu, 2013).

## Microrganismi: Archea e Bacteria, concetti generali

Il suolo rappresenta uno dei più complessi ambienti sulla terra e ospita un'enorme diversità di microrganismi, tra i quali sono presenti funghi, archea e batteri, di cui ancora si conosce molto poco. Essi costituiscono il microbiota del suolo e svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della fertilità del suolo e della sua produttività. Tra questi microrganismi i più complessi biologicamente sono i funghi, appartenenti al dominio degli eucarioti e presentando quindi un'organizzazione cellulare complessa con organelli e nucleo; gli Archea e i Batteri invece appartengono al dominio dei procarioti, organismi viventi sprovvisti di nucleo e compartimentazione interne.

Il suolo è una matrice ambientale estremamente complessa e formata da una parte liquida, gassosa e solida, composta questa sia da minerali che materiale organico. Il suolo coincide con la pedosfera, che interagisce contestualmente con la litosfera, l'idrosfera, l'atmosfera e la biosfera a diversa scala. Queste interazioni portano il suolo a essere un ambiente estremamente dinamico ed eterogeneo, sia in termini tessiturali che chimici per esempio, capace di ospitare una ricca biodiversità. La parte più vitale di un suolo coincide solitamente con il topsoil, ossia la sua parte superficiale. Essa ospita sia una microfauna/flora (dimensioni tra 1 e 100  $\mu\text{m}$ ), che una mesofauna (dimensioni da 100  $\mu\text{m}$  a 2 mm) e una macrofauna (dimensioni oltre i 2 mm). Nel suolo l'attività microbica, ossia della microfauna/flora, si concentra negli hotspot microbici, volumi dell'ordine dei micrometri, dove avvengono importanti processi ecosistemici. Tra i principali hotspot microbici vi sono la rizosfera, la drilosfera e la detritosfera. La rizosfera corrisponde al volume di suolo occupato da radici vive. Essa si forma grazie all'azione delle radici, capaci di scavare il suolo ed emettere essudati radicali con cui variano le condizioni chimiche locali. La drilosfera corrisponde ai biopori, formati dal passaggio di animali nel suolo. La detritosfera è invece formata dall'azione dei decompositori, come i funghi, a partire dalla rizosfera in seguito alla decomposizione delle radici e la formazione di volumi liberi. Negli hotspot microbici del suolo è possibile trovare oltre all'elevata attività microbica, anche un'elevata diversità di specie. La durata degli hotspot microbici del suolo dipende dal tipo di specie e dalla quantità di carbonio labile presenti (Jeffery et al., 2010).

Gli Archea e i Batteri costituiscono due regni distinti all'interno del dominio dei procarioti con differenze sostanziali dal punto di vista biologico, nonostante condividano

molte somiglianze come la riproduzione asessuata e il trasferimento genico orizzontale attraverso la trasformazione, la coniugazione e la trasduzione. La trasformazione prevede l'assorbimento di materiale genetico, rilasciato nell'ambiente in seguito a fenomeni di lisi, da parte di un organismo. La coniugazione si basa su un contatto temporale tra due cellule, una detta donatrice e l'altra ricevente, attraverso i pili sessuali e i plasmidi di fertilità coniugativi. La trasduzione prevede il trasferimento genico attraverso la mediazione di un virus, detto batteriofago, e può essere generalizzata o specifica, quando è selettiva verso piccole regioni di cromosoma trasferibili. La riproduzione e lo scambio genico nei procarioti sono due processi distinti e i meccanismi del trasferimento genico sono tutti unidirezionali, quindi il DNA è ricevuto da un organismo ricevente da un donatore senza la divisione cellulare. I procarioti presentano un sistema di protezione contro le infezioni da virus noto come CRISPR, diverso da quello eucariotico come l'interferenza da RNA (RNAi). In entrambi i regni di procarioti il DNA è circolare e libero nel citoplasma, dove avviene contestualmente la trascrizione e la traduzione a differenza della cellula eucariotica, dove i processi sono separati nello spazio. Il DNA strutturato a cromosoma circolare singolo è trascritto solitamente a gruppi di geni controllati come unità, note come operoni. Una singola molecola di mRNA nei procarioti può essere tradotta in diverse proteine grazie alla natura policistronica della molecola, ossia porta le informazioni di più geni. La regolazione della trascrizione nei procarioti si basa sull'attività di proteine leganti il DNA, con funzioni sia di attivatori che di repressori verso specifici siti dei promotori.

In termini di differenze le più significative consistono nella diversa struttura della parete e membrana cellulare. Gli Archea presentano una parete cellulare di pseudo-peptidoglicano e la membrana interna costituita da glicerolo a chiralità L con legami eteri; i batteri invece presentano una parete cellulare di peptidoglicano e una membrana interna costituita da glicerolo-3-fosfato a chiralità D con legami esteri. Gli Archea, a differenza dei batteri, presentano gli introni: regioni di DNA non codificanti che permettono lo splicing, rendendo il processo di trascrizione molto più simile a quello degli eucarioti. L'apparato trascrizionale degli Archea può considerarsi una variante ancestrale di quello eucariotico, che appare essere il più complesso. Gli Archea come i batteri presentano un unico tipo di RNA-polimerasi DNA-dipendente, ma la differenza sta nella struttura, che è molto più complessa nei primi. Anche il sistema di traduzione degli Archea presenta

delle similarità in termini proteici con quello degli eucarioti, nonostante il loro sistema di ribosomi (70S) abbia rRNA con dimensioni simili a quello batterico. Gli Archea, a differenza dei batteri, comprendono un maggior numero di organismi estremofili, capaci quindi di vivere in ambiente estremi.

Le caratteristiche dei procarioti, sia Archea che Batteri, li rendono organismi capaci di popolare un esteso numero di microambienti, tra cui il suolo. Essi rivestono un ruolo primario nei cicli biogeochimici degli elementi all'interno degli ecosistemi, supportandone così i complessi equilibri. Possono essere sia autotrofi, cioè produttori, che eterotrofi, cioè consumatori.

A livello globale il microbiota di un suolo presenta pochi filotipi comuni condivisi e il trend sembra essere piuttosto caratterizzato da filotipi rari e poco abbondanti. Questo andamento suggerisce che globalmente le comunità microbiche del suolo siano tipicamente dominate da ristretti sottoinsiemi di filotipi, in maniera analoga a quanto accade con le piante. I phyla più abbondanti e ubiquitari includono: gli Alphaproteobacteria, i Betaproteobacteria, gli Actinobacteria, gli Acidobacteria e i Planctomycetes. Gli Actinobacteria sono il phylum che ottiene il maggior interesse ambientale e comprendono batteri capaci di instaurare simbiosi con le piante e fissare biologicamente l'azoto, come il genere *Frankia*, mentre i Betaproteobacteria comprendono generi coinvolti nei cicli biogeochimici dei vari nutrienti e capaci di regolare il pH del suolo. Gli Alphaproteobacteria invece comprendono generi, come il *Rhizobium* e il *Wolbachia*, capaci di svolgere importanti endosimbiosi sia con piante che con animali. I fattori ambientali che influenzano maggiormente le comunità microbiche di un suolo a scala globale corrispondono al pH, i fattori climatici, quali l'aridità, le temperature massime e le precipitazioni, e la produttività primaria vegetale. Altri importanti fattori capaci di influenzare le comunità microbiche localmente sono i flussi di radiazione UV netta incidente, la tessitura del suolo, il carbonio totale, le concentrazioni di azoto e fosforo, il rapporto C/N e il tipo di ecosistema dominante, forestale o prativo. Ogni filotipo ha le proprie preferenze ecologiche, pertanto la variazione dei parametri ambientali comporta un cambiamento nella biodiversità locale e nei processi ad essa legati. La presenza di determinati filotipi, attraverso l'analisi dei loro tratti, quindi può essere usata per caratterizzare i processi pedologici chiave a scala

globale, considerando i principali fattori capaci di alterare le comunità microbiche (Delgado-Baquerizo et al., 2018).

Le attività antropiche, insieme alla vegetazione e alla fauna, hanno impatti diretti sul microbiota del suolo a scala locale. Il tipo di regione geografica, oltre ai gradienti chimici e di temperatura, sembra avere tra i vari tipi di suolo un importante ruolo nella determinazione del microbiota a scala locale, soprattutto per i batteri, i funghi e i nematodi. I gradienti di pH e dei principali nutrienti a scala regionale e locale sono maggiormente correlati positivamente e linearmente alle comunità di batteri e funghi. La temperatura invece a scala locale presenta raramente un andamento lineare con le comunità microbiologiche, rendendo più difficile le possibili generalizzazioni sull'impatto delle condizioni meteorologiche sul microbiota del suolo (Bao et al., 2012). La diversità del microbiota del suolo ha un ruolo fondamentale nella conservazione degli ecosistemi terrestri grazie a tutti i processi ecologici ad essa legati. Una ridotta diversità batterica può causare una mancanza di ridondanza funzionale negli ecosistemi, minacciandone il funzionamento stesso con possibili conseguenze dirette per il benessere umano che attualmente sono ancora poco considerate. Per ridondanza funzionale si intende la presenza di molteplici specie nell'ecosistema capaci di attuare le stesse funzioni senza dover necessariamente competere tra loro. L'assenza di un'elevata ridondanza funzionale nelle comunità microbiche comporta che una qualsiasi perdita di diversità può alterare la capacità di supporto alle funzioni ecosistemiche, minacciando così il mantenimento di numerosi processi, tra cui figurano anche servizi ecosistemici (Mendes et al., 2015). Generalmente è stato osservato che i cambiamenti del microbiota del suolo in termini di ricchezza specifica hanno impatti più importanti sulle funzioni ecosistemiche, rispetto a quelli di composizione o abbondanza (Delgado-Baquerizo et al., 2016). Questo fenomeno accomuna la diversità di macro-organismi, come piante e animali, e quella di microrganismi a livello di ecosistema; pertanto la perdita anche di un ridotto numero di specie batteriche in un ecosistema può avere forti impatti negativi sull'intero ecosistema, sia per le sue funzioni che per i servizi forniti da esso (Delgado-Baquerizo et al., 2016).

I microrganismi e il loro corredo genetico per miliardi di anni si sono diffusi nel pianeta grazie a forze fisiche come correnti d'aria e acqua. Queste forze hanno determinato i patterns biogeografici a scala globale per i microrganismi che sono simili a

quelli esistenti per animali e piante. Le attività antropiche e i rifiuti prodotti dall'uomo attualmente stanno modificando le distribuzioni biogeografiche dei microrganismi (Zhu et al., 2017). Per esempio, la presenza di composti chimici persistenti e di residui di antibiotici tra i reflui antropici causa una selezione tra le comunità batteriche, stimolando risposte allo stato di stress capaci di indurre mutazioni. L'attività antropica introduce nell'ambiente nuove variabili capaci di conferire vantaggi adattativi e operare una selezione tra le comunità microbiche. Inoltre, il movimento intercontinentale di uomini e animali comporta il trasporto e l'arricchimento di determinate specie tra i microrganismi. Questo altera i patterns biogeografici preesistenti naturalmente, sia in termini di specie che di abbondanza. I batteri, legati ai microbiomi dell'uomo e delle principali specie da lui allevate, recentemente hanno incrementato la loro diffusione a scala globale grazie alla globalizzazione. Sembra che le attività antropiche abbiano incrementato l'omogeneità specifica all'interno delle comunità microbiche, causandone la riduzione degli endemismi, in maniera analoga a quanto sta accadendo con i macro-organismi. Questo ha effetti diretti negativi sulla stabilità degli ecosistemi, specie in termini di processi tra cui anche i cicli biogeochimici legati all'attività microbica (Mendes et al., 2015; Thompson et al., 2017). L'attività antropica sta causando l'attuale cambiamento climatico, che, inteso come riscaldamento atmosferico, ha delle ripercussioni dirette sull'attività microbica del suolo. Il riscaldamento infatti, incrementa il tasso di respirazione del suolo e di degradazione della lettiera, oltre ad alterare la composizione locale delle piante con conseguenze indirette sulla composizione specifica del microbiota. Il riscaldamento inoltre, può ridurre localmente il contenuto idrico del suolo con importanti ripercussioni sull'intero ecosistema, sia a livello di macrobiota che a quello di microbiota (Li et al., 2016).

#### Archea e Bacteria d'interesse alla nitrificazione e denitrificazione

Le trasformazioni dell'azoto negli ecosistemi risultano essere più efficienti se svolte da una comunità di microrganismi rispetto a una singola specie, a causa delle limitazioni ambientali. Questo appare ancor più evidente in presenza di perturbazioni negli ecosistemi. Le trasformazioni dell'azoto operate dalle comunità microbiche pertanto formano complesse reti di interazioni tra fattori naturali, legati alla presenza sia di animali che piante, e antropici, che delineano gli ecosistemi sotto i loro aspetti trofici. In questa rete hanno un importante ruolo le competizioni interspecifiche per i substrati, in funzione

dei differenti tipi di metabolismi, ma anche le cooperazioni tra le specie microbiche. Lo stato di competizione e cooperazione non risulta essere statico, bensì dinamico variando in funzione delle condizioni ambientali nel tempo (Kuypers et al., 2018). Per esempio, la presenza di micorrize può alterare all'interno della rizosfera il pH abbassandolo, incrementare il contenuto di carbonio organico e favorire la mineralizzazione dell'azoto. Questi processi tuttavia, possono alterare gli equilibri ecologici tra le comunità di Archea e Batteri nitrificanti, rivelando così parzialmente la complessità delle interazioni tra microrganismi d'interesse per il ciclo dell'azoto (Cavagnaro et al., 2007).

La nitrificazione è operata sia da Archea (AOA) che batteri (AOB) attraverso l'enzima Ammoniaca Monossigenasi (AMO), codificato da entrambi grazie al gene *amoA*. Gli Archea sono i principali artefici del processo negli ecosistemi acquatici e in quelli terrestri caratterizzati da condizioni oligotrofiche e con scarso ossigeno presente. Possiedono una resistenza ambientale maggiore rispetto ai batteri, resistendo a temperature minori per esempio. Al contrario, in condizioni ambientali più favorevoli, con maggior disponibilità di nutrienti, i batteri nitrificanti possono prevalere in termini di abbondanza su gli Archea. La dominanza di uno dei due gruppi in termini di abbondanza dipenderebbe da molteplici fattori ambientali, tra cui la disponibilità di nutrienti, la temperatura e la presenza di ossigeno nell'ambiente (Szukics et al., 2012). Un'elevata presenza di substrato di nutrienti disponibile sembra inibire gli AOA, favorendo gli AOB. Questo fenomeno può trovare una spiegazione nella differenza esibita tra i due gruppi per la cinetica di ossidazione dell'ammoniaca, che si pensa, infatti, sia preferibilmente ossidata rispetto all'ammonio dagli AOB, sebbene ad elevate concentrazioni risulterebbe inibire entrambi (Song et al., 2016). Rispetto ai batteri, gli Archea, infatti, risultano avere una forma enzimatica dell'AMO più affine alle basse concentrazioni di ammoniaca e questo li rende più adatti ad ambienti oligotrofici. La forma batterica dell'AMO risulta governare l'ossidazione dell'ammoniaca negli ambienti dove questa abbonda, anche in presenza di maggior AOA (Stein and Arp, 1998). Entrambi i gruppi, soprattutto gli AOA, sono comunque capaci di utilizzare l'ammonio come substrato. La presenza di ammoniaca e ammonio nell'ambiente dipende principalmente dal pH. Un pH acido porta a una maggior concentrazione di ammonio per la presenza di protoni disponibili, che si legano direttamente all'ammoniaca. Le condizioni di pH ambientali quindi possono favorire uno dei due gruppi sull'altro a causa delle differenti preferenze di substrati

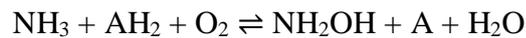
(Szukics et al., 2012). A causa delle differenti preferenze, gli AOB sembrerebbero prevalere a condizioni più basiche mentre gli AOA a quelle più acide, nonostante quest'ultimi appaiono essere più ubiquitari nei suoli anche a diversi range di pH, grazie anche alla loro mixotrofia (He et al., 2012; Kuypers et al., 2018; Leininger et al., 2006; Prosser and Nicol, 2012; Song et al., 2016). Gli Archea sembrerebbero essere inoltre capaci di utilizzare diversi substrati energetici oltre all'ammoniaca e questo spiegherebbe la coesistenza dei due gruppi di microrganismi nei vari ecosistemi, andando a sviluppare una differenziazione tra le nicchie ecologiche. La differenziazione in nicchie ecologiche fa sì che i due gruppi operino in condizioni differenti, minimizzando le competizioni interne (Wessén et al., 2011). Appare chiaro che la distribuzione negli ecosistemi di questi due gruppi di microrganismi dipenda da specifici fattori ambientali, come il già citato pH. Tra i principali fattori, capaci di spiegare i patterns di distribuzione, si ritrovano il substrato di nutrienti, inteso come il carbonio e l'azoto totale, positivamente correlato agli AOB, mentre le condizioni di acidità e il contenuto di argilla agli AOA. Questi differenti fattori si traducono in diverse esigenze ecologiche, che portano i due gruppi alla diversa distribuzione locale. Per esempio, gli AOB tendenzialmente occupano il topsoil, mentre gli AOA possono distribuirsi anche più in profondità nel subsoil grazie alla loro resistenza (Sims et al., 2012). Le abbondanze dei geni *amoA* Archea e bacteria risultano essere correlate ai valori di pH e alle temperature, mentre il rapporto tra AOA e AOB soprattutto alle concentrazioni di ammonio (Cao et al., 2011). Appare chiaro che il rapporto tra AOA e AOB possa essere interpretato come un indicatore dello stato trofico di un ambiente, date le diverse affinità dei due gruppi. Un altro fattore ambientale capace di variare le comunità di AOA e AOB è la vegetazione, che attraverso essudati radicali e diffusione di ossigeno in presenza di aerenchima, altera le abbondanze microbiche nella rizosfera in molteplici modi (Gao et al., 2018). Anche a scala globale entrambi i gruppi esibiscono inoltre, patterns biogeografici di distribuzione tra gli ecosistemi terrestri in accordo con gli specifici fattori ambientali e la ripartizione delle nicchie ecologiche (Wessén et al., 2011).

### Geni *amoA* e *nosZ*: concetti generali

I geni *amoA* e *nosZ* possono essere considerati dei marker molecolari funzionali, utilizzabili nella caratterizzazione di processi biologici d'interesse ambientale, legati al ciclo dell'azoto, attraverso tecniche d'indagine quantitative come la realtime-PCR (Cao

et al., 2011; Cavagnaro et al., 2008). Questi geni possono essere utilizzati per quantificare il potenziale nitrificante e denitrificante di una matrice ambientale, come il suolo, senza però fornire reali informazioni riguardo l'effettiva attività microbica in atto.

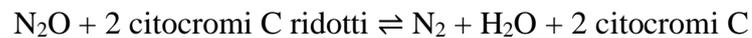
Il gene *amoA* codifica per la subunità alfa dell'enzima AMO o Ammonio Monossigenasi, che catalizza l'ossidazione dell'ammonio in idrossilammina (NH<sub>2</sub>OH), intermediario nella nitrificazione. Questo gene è stato largamente ritrovato in molti ambienti differenti: suoli, fiumi e oceani. L'Ammoniaca Monossigenasi è presente sia tra i batteri (AOB) che gli Archea (AOA) e la loro abbondanza relativa varia in base a fattori ambientali come il pH e il quantitativo di ammoniaca disponibile. Questo enzima catalizza la seguente reazione di ossidazione:



L'idrossilammina, prodotto dell'ossidazione dell'ammoniaca operata dall'AMO, è successivamente ossidata a nitrito per opera dell'enzima Idrossilammina Ossireduttasi (HAO). L'ossidazione dell'ammoniaca è una reazione acidogena, poiché libera nell'ambiente protoni riducendo i valori di pH. La nitrificazione è una reazione di ossidazione che avviene in ambiente aerobico, pertanto l'attività enzimatica dell'Ammoniaca Monossigenasi dipende dal tasso di diffusione dell'ossigeno molecolare nella matrice ambientale. Questo enzima presenta come cofattore il rame (Cu), che risulta indispensabile per la sua attività ossidativa. La sua attività risulta quindi essere limitata in ambienti dove sono presenti specie chelanti il rame, come la tiourea o tiocarbammide, che è l'analogo solforato dell'urea. L'enzima AMO può essere represso da inattivatori metabolici come la nitrapyrin, nota anche come battericida e inibitore della nitrificazione. L'inattivazione dell'enzima può essere anche causata dalla presenza di alte concentrazioni di nitrito, che in seguito alla riduzione a specie reattive come il monossido di azoto, potrebbe formare complessi metallici attraverso legami covalenti con metalli come rame e ferro. Il nitrito, infatti, in ambiente acido tende spontaneamente a ridursi a monossido di azoto, che risulta tossico per molte specie batteriche proprio a causa della formazione di complessi metallici, capaci di interagire con gli enzimi batterici (Stein and Arp, 1998). Questi complessi metallici ridurrebbero l'affinità dell'enzima con l'ossigeno impedendo l'ossidazione dell'ammoniaca a idrossilammina. La presenza di un ambiente anaerobico inoltre induce l'enzima ad assumere lo stato ridotto, che è suscettibile all'interazione con il nitrito e alla conseguente sua inattivazione. La riduzione dell'attività

ossidativa enzimatica dell'AMO può avere anche ripercussioni ecologiche (Stein and Arp, 1998). Le caratteristiche genetiche degli AOA e degli AOB suggeriscono una diversificazione nell'ossidazione dell'ammoniaca per via di diversità nei geni codificanti il citocromo c e l'HAO (He et al., 2012). Queste differenze genetiche infine, comportano la diversità nella fisiologia e nei processi enzimatici tra i due gruppi, che possono spiegare le loro differenziazioni in termini di nicchie ecologiche (Szukics et al., 2012).

Il gene *nosZ* codifica per l'enzima ossido nitroso reduttasi (N2OR), appartenente alla classe delle ossidoreduttasi. Questo enzima è presente nella membrana interna o nel periplasma di numerose specie batteriche, che rivestono un ruolo centrale nel ciclo dell'azoto a causa dell'elevato potenziale di riscaldamento globale del protossido di azoto. La reazione catalizzata dall'ossido nitroso reduttasi fa parte della denitrificazione, che avviene in ambiente anaerobico e interessa una sequenza di processi riduttivi, ognuno con uno specifico enzima capace di estrarre a ogni step un atomo di ossigeno. Nel caso dell'enzima decodificato dal gene *nosZ* la reazione è la seguente, corrispondente allo step finale della denitrificazione:



Il gene *nosZ* è contenuto nel cluster genetico *nosRZDFYL*, codificante gli altri enzimi coinvolti nel processo di denitrificazione. L'enzima ossido nitroso reduttasi contiene due siti di reazione caratterizzati dalla presenza di rame, noti come Centro CuZ e Centro CuA. Questi centri hanno un ruolo fondamentale nel processo riduttivo o di estrazione dell'ossigeno dalla specie azotata, ma anche nella classificazione dell'enzima stesso, variandone la forma in base al loro stato ossidativo. Il gene risulta essere regolato dalla presenza di ossidi di azoto, ma non sono ancora ben noti i meccanismi di tale regolazione (Pauleta et al., 2013). La caratterizzazione della diversità e abbondanza nel suolo del gene *nosZ* permette di delineare il potenziale di riduzione del perossido di azoto in azoto molecolare (Orellana et al., 2014).

## Pascolamento e Pascoli

### Pascolamento e Pascoli: concetti generale

Il pascolamento è una pratica diffusa in diversi contesti, che permette di ottenere prodotti ad alto valore nutrizionale tramite l'utilizzo di risorse non direttamente utilizzabili dall'uomo. La ridotta competizione con l'uomo deriva direttamente dagli erbivori, specie i ruminanti, che praticano il pascolamento e che sono in grado di sfruttare l'energia chimica dei legami della cellulosa. Questo permette un ridotto uso di concentrati, che sono appunto utilizzati anche dall'uomo nella sua dieta, e di conseguenza rende un sistema zootecnico basato sul pascolamento meno competitivo. Inoltre, secondo la teoria del "disturbo ecologico" un livello intermedio di intensità nel pascolamento permetterebbe di massimizzare la biodiversità di un ecosistema, garantendo una maggiore disponibilità di nicchie ecologiche e ostacolando la dominanza di singole specie sulle altre. Pertanto, il pascolamento può ritenersi una pratica indispensabile per il mantenimento delle praterie secondarie. In quest'ottica questa pratica può essere interpretata come uno strumento di gestione, con cui si può direttamente intervenire sul mantenimento della vegetazione e la regolazione delle successioni ecologiche.

Il pascolamento particolarmente legato all'attività zootecnica montana è caratterizzato da piccole mandrie con razze solitamente a duplice attitudine e rustiche. In questo tipo di attività zootecnica tradizionalmente i capi durante il periodo invernale sostano nelle stalle a valle e nei pascoli durante quello estivo, in seguito alla monticazione, anche se questo legame sta subendo profondi cambiamenti (Sturaro et al., 2013). I pascoli montani forniscono materia grezza come foraggi, alimenti, servizi ricreativi-culturali e supporto per le attività umane, come piante medicinali e protezione ambientale, prevenendo l'erosione del suolo o limitando il rimboschimento. Appare chiaro quindi che i pascoli montani, derivati direttamente dall'attività zootecnica montana, contribuiscono attivamente al mantenimento e allo svolgimento di svariati processi ecosistemici, tra cui figurano anche servizi ecosistemici. I processi ecosistemici a differenza dei servizi interessano l'intera comunità di un ecosistema, mentre gli altri si indirizzano specificatamente verso l'uomo. Il pascolamento, pertanto, può incrementare l'HNV o High Natural Value di un ecosistema prativo, favorendo localmente la biodiversità attraverso l'adozione di pratiche agronomiche tradizionali a basso input. I servizi ecosistemici riconducibili al pascolamento montano possono essere classificati

nelle quattro principali categorie: supporto, regolazione, approvvigionamento e culturale. Le condizioni ambientali, culturali e socioeconomiche influenzano direttamente il sistema zootecnico con ripercussioni indirette sull'ecosistema. Un'errata gestione del sistema zootecnico può portare allo sviluppo di disservizi ecosistemici, che causano danni al posto di benefici all'ecosistema e all'uomo. Un esempio di disservizio ecosistemico può essere l'erosione del suolo in seguito a un'eccessiva defogliazione per il sovrapascolamento nei contesti ad attività intensiva. Tra i principali disservizi ecosistemici legati al pascolamento a scala globale si ritrovano la desertificazione derivata dal sovrapascolamento in ambienti aridi, la deforestazione per la formazione di pascoli e un uso prolungato della risorsa vegetale nel tempo, e le emissioni di gas serra per l'uso di combustibili fossili nelle pratiche zootecniche, la produzione di metano ruminale e di ossidi di azoto dalla gestione dei reflui.

La zootecnia montana attualmente è soggetta a due processi: l'intensificazione a valle e l'abbandono dei pascoli e delle aree meno favorevoli, che causano localmente importanti variazioni degli agroecosistemi. Tali processi sono causati sia da fattori ambientali e socioeconomici. Tra quelli ambientali figurano l'alta altitudine, i suoli poveri, le pendenze, le condizioni climatiche estreme, le corte stagioni di crescita e la ridotta presenza di infrastrutture; tra quelli socioeconomici, invece, vi sono il ridotto turnover generazionale e la sempre più elevata richiesta produttiva. L'intensificazione a valle è un processo che trova le sue origini durante la "Rivoluzione Verde", iniziata lo scorso secolo, e ha portato alla riduzione progressiva del numero di allevamenti di piccole e medie dimensioni d'alta quota con la formazione di pochi e grandi sistemi vocati a una maggiore produttività a livello globale. L'intensificazione a valle ha portato con sé anche la visione dei prati come cropland, ossia sistemi delineati alla pura produzione. L'abbandono dei pascoli sta portando alla progressiva diminuzione delle praterie secondarie e all'aumento della rifeorestazione naturale con variazioni a livello sia ecosistemico che paesaggistico, oltre alla riduzione nelle provigioni di foraggio localmente. L'abbandono dei pascoli può inoltre, a seguito della naturale rifeorestazione, incrementare il rischio di incendi sia per la presenza di più specie arbustive ed arboree e sia per la mancata gestione ambientale locale. Questo processo tuttavia ha portato in sé alcuni benefici, come l'aumento del sequestro di carbonio da parte delle specie arboree e arbustive legate alla rifeorestazione; la rifeorestazione, tra le sue esternalità positive, ha

anche incrementato localmente la produzione di legname. L'intensificazione a valle e l'abbandono dei pascoli stanno inoltre, avendo un impatto sulla transumanza, alterando così le tradizioni culturali.

Il mantenimento delle aree montane in Europa attraverso il pascolamento si esplica attraverso una serie di esternalità positive, che sono direttamente riconducibili a servizi ecosistemici. Tra le esternalità positive direttamente riconducibili agli alpeggi vi sono la regolazione microclimatica delle praterie secondarie, la regimazione delle acque, il contenimento dei rischi di valanghe e di incendi, la conservazione del patrimonio genetico delle razze endemiche allevate, il mantenimento del paesaggio, delle tradizioni culturali locali e del funzionamento del suolo e la salvaguardia della biodiversità, specie per l'avifauna e l'entomofauna, con tutti i processi annessi, tra cui l'impollinazione. Queste esternalità possono essere classificate come beni pubblici, pertanto ogni individuo può beneficiarne senza ridurne la disponibilità per gli altri. La natura di bene pubblico fa sì che le esternalità positive legate al pascolamento montano non siano beni di mercato, quindi soggetti al modello di domanda e offerta canonico. Il mantenimento del sistema zootecnico montano, inoltre, può incentivare lo sviluppo delle comunità rurali locali attraverso le sue esternalità al di là del suo valore economico. Il sistema zootecnico montano quindi si figura essere parte di una agricoltura multifunzionale, capace di rivestire più ruoli e offrire molteplici output, sia come beni privati che pubblici, oltre alle esternalità.

L'impatto del sistema zootecnico, specie quello montano, può essere di duplice natura: positivo e negativo, in funzione del contesto in cui è presente e in base all'indirizzo antropico dato. La sostenibilità delle pratiche zootecniche quindi non è immediatamente determinabile, ma occorre una corretta contestualizzazione, in relazione anche alle sue esternalità. La sostenibilità può essere intesa come un corretto utilizzo delle attuali risorse per il perseguimento dei fini umani pur mantenendo la capacità naturale di un ecosistema di fornirle in modo continuativo nel tempo insieme ai servizi ecosistemici. Il concetto di sostenibilità quindi risulta essere legato a quello di risorsa, che varia a seconda del contesto considerato. In linea di massima un sistema risulta essere sostenibile quando utilizza le risorse attuali per lo svolgimento dei propri processi, senza però pregiudicarne quello futuro. La sostenibilità di un sistema, come quello zootecnico può essere determinata attraverso l'adozione di indicatori per le pratiche e le esternalità

derivata. Il Life Cycle Assessment o L.C.A. permette di stimare la sostenibilità di un sistema attraverso un complesso approccio, basato su vari indicatori di diversa natura. Tra i possibili indicatori, utilizzabili anche per determinare i servizi ecosistemici dei sistemi zootecnici, vi sono quelli diretti, che derivano da misure. Tra questi, di natura biofisica, possono essere considerati anche le misure dei geni legati a processi biologici in relazione all'inquinamento e il cambiamento climatico, come la nitrificazione con gli *amoA* e la denitrificazione con i *nosZ*. Questi geni quindi possono essere utilizzati per determinare le esternalità di un sistema zootecnico e la sua sostenibilità.

I sistemi zootecnici possono contribuire al cambiamento climatico con l'immissione di gas serra in atmosfera, come il protossido di azoto (N<sub>2</sub>O) e il metano (CH<sub>4</sub>). Occorre precisare che l'anidride carbonica emessa dagli animali a seguito della respirazione non può essere considerata come contributo al riscaldamento globale in quanto in equilibrio con il ciclo del carbonio, nello specifico con i produttori primari vegetali. L'impatto ambientale in termini di emissioni di CO<sub>2</sub> non è pertanto imputabile agli animali in sé, ma ad altri fattori. Tra questi fattori rientrano le trasformazioni dei prodotti, il sovrapascolamento, la cattiva gestione delle colture alimentari e il trasporto degli alimenti, capi e produzioni. Le emissioni di metano invece sono imputabili agli animali allevati poiché questo gas serra è prodotto da processi fisiologici a livelli differenti in base alla natura monogastrica e poligastrica. Gli animali monogastrici emettono un minor quantitativo di metano a seguito dei processi digestivi, mentre ai poligastrici corrispondono emissioni più importanti per via delle fermentazioni anaerobiche ruminanti. Le emissioni di questo gas serra dipendono dal tipo di sistema produttivo, dalle caratteristiche delle regioni di produzione, dal tipo di dieta, dalla gestione dei reflui, dalle specie e razze allevate, insieme anche all'età del capo. Occorre considerare che la formazione del metano è data dalla fermentazione anaerobica batterica, che è agevolata da condizioni ambientali riducenti, alte temperature e bassi rapporti carbonio-azoto. Le emissioni di protossido di azoto della filiera zootecnica sono connesse al tipo di refluo prodotto e alla sua gestione. L'azoto è emesso sotto forma di urea, che va incontro a una rapida idrolisi capace di trasformarlo in ammoniaca. Questa può volatilizzare o fungere da substrato per la nitrificazione da parte dei microrganismi. L'ammoniaca volatilizzata in atmosfera agisce come base, andando a tamponare il fenomeno delle piogge acide con la formazione di sali, ma contestualmente incrementa

le deposizioni azotate al suolo con possibili contributi all'eutrofizzazione. Quando nell'ambiente sono presenti alternativamente condizioni sia ossidanti che riducenti, l'ammoniaca può essere trasformata dai microrganismi in protossido di azoto grazie a processi di nitrificazione seguiti da quelli di denitrificazione. La gestione dei reflui zootecnici a fronte di ciò appare delicata in quanto in presenza di condizioni ossidanti si riducono le emissioni di metano, ma si favorisce la formazione di nitrati, che in condizioni successivamente riducenti possono trasformarsi in protossido. Appare chiaro quindi che una riduzione contestuale di metano e protossido di azoto dai reflui zootecnici richiede condizioni contrastanti.

Le praterie sono tra gli ecosistemi più diffusi al mondo, ricoprendo circa il 40% delle terre emerse. Esse contengono circa il 10% della biomassa terrestre e contribuiscono tra il 20% e 30% all'insieme del carbonio organico del suolo globale (Zhong et al., 2015). Le praterie rivestono un potenziale ruolo nella mitigazione del cambiamento climatico grazie alla loro capacità di sequestrare l'anidride carbonica atmosferica come carbonio stabile nel suolo. Questa loro capacità tuttavia dipende da numerosi fattori e tra quelli biotici spiccano il grado di intensità del pascolamento, le specie animali e vegetali presenti. Il tipo di allevamento, di prateria e le condizioni climatiche locali contribuiscono a delineare i possibili impatti a livello ecosistemico del pascolamento. Un'intensa attività di allevamento può trasformare le praterie da sink di carbonio a source, andando così a contribuire al cambiamento climatico con l'emissione di gas serra. L'intensità del pascolamento può contribuire direttamente alla modifica della struttura del suolo, alterando le sue funzioni e la sua capacità di immagazzinamento di carbonio organico. Quest'ultima componente nel suolo ha un ruolo fondamentale per svariati processi ecosistemici, tra cui figurano anche servizi ecosistemici, come la ritenzione di acqua e nutrienti e l'attenuazione di inquinanti per adsorbimento. La riduzione di SOC ha effetti diretti sulla fertilità del suolo e la sua degradazione. L'intensità del pascolamento altera anche altri indicatori di qualità per le praterie. Tra questi indicatori spiccano anche l'azoto totale (TN) (Abdalla et al., 2018).

Il pascolo è un agroecosistema caratterizzato da specie vegetali erbacee, arbustive e arboree, riconducibile alle praterie tra gli ecosistemi naturali. L'erba del pascolo viene utilizzata direttamente dagli animali erbivori, che sono liberi di accedere all'area o per

lunghe parti della giornata o continuamente. È l'agroecosistema che più si avvicina alle caratteristiche degli ecosistemi naturali, in quanto in esso si ritrovano organismi autotrofi e animali utilizzatori, sia allevati che selvatici talvolta. Gli animali selvatici possono essere presenti nei pascoli in assenza di recinzioni, quindi quando l'ambiente è aperto. I pascoli inoltre presentano una ridotta pressione di tecniche agronomiche solitamente e questo favorisce l'insediamento di specie animali e vegetali selvatiche. Solitamente i pascoli sono gestiti al fine di favorire l'affermazione e il mantenimento di specie pabulari, che sono utilizzate dagli animali per alimentarsi in condizioni naturali. Tra le famiglie più presenti nei pascoli vi sono quella delle Poacee e quella delle Fabacee. Le specie arboree e arbustive nei pascoli forniscono zone di riparo e di ombreggiamento, ma non sono solitamente sfruttabili direttamente come risorse alimentari dagli animali allevati. La fertilizzazione in questi habitat semi-naturali è rappresentata dal rilascio delle deiezioni degli animali e raramente viene integrata con l'impiego di concimi chimici. Solitamente si adibiscono a pascolo aree a bassa vocazione agronomica e la loro gestione può essere considerata di tipo estensiva (Borin, 1999). Le zone adibite al pascolamento possono trovarsi in pianura, collina e montagna. I pascoli possono essere permanenti in presenza di bestiame stazionario per gran parte dell'anno, oppure possono essere temporanei quando vi sono colture discontinue o a riposo. In montagna i pascoli vengono sfruttati durante l'estate attraverso l'alpeggio e si possono ritrovare in altopiani, valli o radure sopra i limiti della vegetazione arborea. L'alpeggio inizia verso giugno con la monticazione e termina con la demonticazione a fine settembre. L'alpeggio fa parte della transumanza, ossia la migrazione stagionale delle mandrie, delle greggi e dei pastori tra i pascoli di pianura, di collina e di montagna. Il pascolamento è una pratica di gestione importante al fine di mantenere le praterie libere da arbusti e alberi, ma anche per conservare la biodiversità in stazioni ripide e irregolari. Può essere usato anche per gestire in modo passivo le opere di restauro ecologico di praterie seminaturali ad elevato pregio naturalistico ed ecologico, come i brometi. Al fine di massimizzare la biodiversità locale, il pascolamento dovrebbe essere condotto durante i periodi primaverili e autunnali, poiché durante l'estate le specie vegetali producono le semenze e gli invertebrati solitamente affrontano la fase riproduttiva. Il pascolamento permanente a basso carico con bovini e condizioni climatiche favorevoli può essere usato per favorire la formazione delle praterie ricche in specie. Il pascolamento estensivo ha, quindi, effetti positivi sulle praterie

seminaturali e, come loro gestione, introduce valori aggiunti, tra cui quelli culturali ed estetici-paesaggistici (Scotton et al., 2012). Questo è in accordo con l'ipotesi ecologica del "disturbo intermedio", che associa il massimo valore di biodiversità con un livello d'uso estensivo dell'ecosistema. La possibile spiegazione ecologica alla base di questa teoria consiste nello sviluppo e mantenimento di più nicchie nell'ecosistema con un uso estensivo o intermedio rispetto all'abbandono o all'uso intensivo delle risorse presenti. La presenza di più nicchie può contenere la dominanza di determinate specie, andando così a favorire la biodiversità locale (Bernués, 2017). Inoltre, il pascolamento estensivo può favorire la capacità di ritenzione idrica dei suoli e aumentarne la fertilità, grazie alla redistribuzione e reintroduzione attraverso le deiezioni di nutrienti (Panayiotou et al., 2017).

#### **Pascolamento: impatti principali sugli ecosistemi terrestri**

Il pascolamento di animali allevati è un'attività dai possibili molteplici impatti ambientali, sociali e culturali. I vari impatti ambientali di questa pratica hanno ricadute anche sul suolo, sulla produzione delle piante e la struttura stessa delle praterie, ecosistemi di elevato pregio naturalistico. Il pascolamento si può considerare uno tra i metodi di gestione delle praterie più diffuso e tra i pascoli montani si attua con l'alpeggio nelle malghe durante i mesi estivi. In questo periodo le vacche sono nella fase finale di lattazione o in asciutta. Il pascolamento opera sia direttamente che indirettamente sull'ecosistema delle praterie con ripercussioni sulla natura del substrato d'interesse per i microrganismi e le piante, sulla disponibilità dei nutrienti e sulle successioni ecologiche (Zhao et al., 2017). La defogliazione, il calpestamento e la fertilizzazione sono i principali impatti diretti operati dagli animali al pascolo. Gli effetti del pascolamento sulla comunità prative dipendono principalmente dal suo grado di intensità (Aldezabal et al., 2015; Zhao et al., 2017). La sua intensità può affliggere l'ecologia della comunità pedologica delle praterie, ma anche il tasso di respirazione del suolo attraverso le escrezioni, la variazione del contenuto idrico e degli equilibri energetici per effetto del calpestamento (Zhao et al., 2017).

La defogliazione riduce la biomassa aerea delle piante, riducendo l'input della materia organica vegetale per la lettiera. La defogliazione può variare in base alle specie al pascolo, in quanto queste possono mostrare preferenze nei confronti di determinate essenze prative. Il pascolamento pertanto risulta essere eterogeneo, in funzione del

comportamento degli animali (Jerrentrup et al., 2016). Il comportamento degli animali al pascolo è fortemente influenzato dalla pendenza, che può essere considerata come un proxy per i patterns degli impatti legati al pascolamento (Zhong et al., 2016). Altri parametri importanti per delineare il tipo di pascolamento in relazione all'erbivoro sono: le dimensioni del corpo, la morfologia dell'apparato boccale, la fisiologia digestiva e l'anatomia dentale (Rook et al., 2004). Effetti sul pascolamento li hanno anche età e sesso. In Italia vi sono principalmente quattro categorie di erbivori allevati e indirizzati al pascolo: i bovini, gli equini, gli ovini e i caprini. I bovini sono caratterizzati da un pascolo poco selettivo e tendono a strappare la vegetazione, distribuendo inoltre le loro feci in modo sparso ma concentrato. Il grado di pascolamento di questa categoria dipende dall'età dell'animale e dalla produttività della razza, misurata come litri di latte. Nelle aree montane italiane si allevano solitamente animali appartenenti alla razza Pezzata Rossa, alla Bruna o ai gruppi etnici autoctoni dell'arco alpino, come la Rendena o la Grigia Alpina. Durante l'alpeggio le bovine sono nella fase di asciutta o nella fase finale di lattazione, anche se vi è la tendenza attualmente di portare ai pascoli solo le manze e le vitelle per massimizzare la produzione per capo (Bittante et al., 2005). Gli equini invece sono selettivi verso le graminacee, evitando le dicotiledoni, e praticano un pascolamento raso a causa dell'uso degli incisivi. Essi tendono a lasciare patches di vegetazione indisturbata. Gli ovini sono tendenzialmente molto selettivi verso le dicotiledoni se lasciati liberi al pascolo e lasciano il cotico a raso come gli equini. I caprini infine risultano essere molto selettivi verso le specie arbustive e arboree, soprattutto giovani (Rook et al., 2004). La defogliazione può cambiare localmente la composizione floristica, andando a modificare le relazioni competitive tra le specie presenti. Si è osservato che l'assenza di pascolamento può portare a un incremento delle graminoidi, quali Poaceae e Cyperaceae, e a una riduzione delle forbs, quali le Fabaceae (Aldezabal et al., 2015). L'aumento delle specie graminacee comporta una perdita in qualità della lettiera con l'aumento del rapporto C/N. Il rapporto C/N è un indicatore per la decomposizione della lettiera. Un elevato rapporto comporta una presenza più marcata di lignina, che è difficilmente degradabile dai microrganismi. La presenza di forbs, promossa dal pascolamento non eccessivo, incrementa la decomposizione della lettiera abbassando il rapporto C/N grazie al maggior apporto di azoto (Aldezabal et al., 2015). Il disturbo della parte aerea può inoltre indurre le piante a uno sviluppo della parte ipogea, favorendo

l'efficienza degli apparati radicali con conseguenti ripercussioni sulla rizosfera e incrementando lo sviluppo della biomassa microbica del suolo. Un eccessivo pascolamento, tuttavia, può comportare una consistente perdita di tessuti fotosintetici e la conseguente riduzione degli input di carbonio alle radici. Questo si traduce in una minore produzione di essudati radicali e una perdita di dimensioni per le comunità microbiche. Al contrario un pascolamento moderato o leggero può incrementare gli input di carbonio e azoto al suolo, così da supportare una maggiore diversità, a beneficio dell'ecosistema prativo (Zhao et al., 2017). Un altro aspetto legato alla defogliazione è la fluttuazione della temperatura locale del suolo, dovuta a una riduzione della copertura vegetale e a un incremento dell'esposizione diretta al flusso radiativo. Questo causa un aumento della temperatura durante il giorno con molteplici conseguenze nel suolo (Aldezabal et al., 2015). La temperatura è un parametro ambientale capace di influenzare direttamente la diversità e la composizione microbica del suolo. La riduzione di copertura vegetale può aumentare anche l'erosione del suolo, esponendolo maggiormente ad agenti abiotici e biotici con conseguenti possibili impatti negativi sulla produttività primaria dell'ecosistema prativo e la sua resilienza (Teague et al., 2011). La copertura vegetale e la lettiera incrementano le infiltrazioni, tamponano le fluttuazioni di temperatura e riducono il tasso di evaporazione, permettendo al suolo di mantenere più a lungo un maggiore grado di umidità in seguito alle precipitazioni (Chen et al., 2016). Tutto ciò migliora l'attività microbica localmente con conseguente aumento della stabilità degli aggregati del suolo e del sostegno allo sviluppo vegetale (Teague et al., 2011). Infatti, nei pascoli l'attività microbica insieme a quella vegetale, grazie all'alta presenza di specie erbacee con elevata densità radicale, costituiscono un'efficiente assimilazione dell'azoto, capace di ridurre le lisciviazioni (Hackl et al., 1999).

Il calpestamento ad opera degli animali causa la compattazione del suolo con effetti sullo sviluppo delle radici, sulla presenza di pori e sulla disponibilità di ossigeno, diminuendo l'aerazione e l'umidità del terreno (Qu et al., 2016). Questi effetti hanno un impatto diretto sulla comunità microbica del suolo in quanto influenzano direttamente hotspots microbici, quali i pori e la rizosfera, ma inoltre variano la concentrazione di ossigeno molecolare, che determina le condizioni ossidanti dell'ambiente pedologico. Le condizioni ossidanti hanno ricadute sulla biodisponibilità di nutrienti e sulle specie microbiologiche presenti, modificando l' $\alpha$  diversità dei microrganismi (Li et al., 2016).

Inoltre, il calpestamento può indurre le piante a variare la produzione di essudati radicali, che giocano un ruolo fondamentale nella gestione delle comunità microbiche pedologiche (Qu et al., 2016). Tutto ciò può anche indurre cambiamenti sulla comunità vegetale localmente presente (Aldezabal et al., 2015).

Le deiezioni degli animali allevati, in quanto substrati labili, possono contribuire a incrementare le attività metaboliche microbiche e la biomassa microbica (Chen et al., 2016). Gli erbivori al pascolo possono quindi alterare i cicli dei nutrienti, reintroducendo carbonio, azoto e fosforo. Le urine possono aumentare il pH del suolo attraverso il rilascio di anioni ossidrilici ( $\text{OH}^-$ ) durante l'idrolisi dell'urea ad ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ), convertibile successivamente ad ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), innalzando contestualmente la concentrazione di azoto inorganico nella matrice ambientale (Prieto et al., 2011). Nei suoli in presenza di pascolamento, infatti, sono state riscontrati incrementi nei tassi di nitrificazione e denitrificazione in termini di abbondanza di geni *amoA* e *nosZ* grazie all'aumento di substrato azotato introdotto con le deiezioni (Zhong et al., 2015).

La comunità microbica del suolo è la base per il riciclo, la conversione e l'uso dei nutrienti negli ecosistemi. Essa risulta strettamente legata alla comunità vegetale e animale sia superficiale che interna al suolo stesso tramite impatti positivi, neutri e negativi. La comunità microbica risulta fortemente influenzata dal pH, l'umidità, il carbonio organico del suolo (SOC), l'azoto e dal rapporto C/N (Qu et al., 2016). Le piante hanno un ruolo molto importante per quanto concerne la comunità microbica del suolo perché attraverso l'apparato radicale possono alterare la quantità d'acqua presente, la chimica della lettiera con i loro essudati radicali e le proprietà sia pedologiche che microclimatiche (Li et al., 2016). Le piante quindi possono facilmente alterare i parametri fisico-chimici del suolo, come il pH, la conducibilità elettrica e il contenuto dei nutrienti, variandone anche la biodisponibilità. Alcune specie vegetali inoltre favoriscono determinate specie microbiche grazie a una stretta coevoluzione con esse (Qu et al., 2016). La perdita di materiale vegetale sopra e sotto il terreno può essere considerato in definitiva come una riduzione d'energia disponibile per la crescita microbica e le altre attività biologiche (Northup et al., 1999; Song et al., 2016) Sono sempre più numerose le evidenze che la struttura della vegetazione influenza sia la densità che la composizione della comunità del suolo (Aldezabal et al., 2015). Il pascolamento, a fronte di ciò, può impattare in definitiva sulla comunità microbica direttamente alterando le proprietà

fisico-chimiche del suolo e indirettamente attraverso la variazione della comunità vegetale (Panayiotou et al., 2017). Il pascolamento può anche alterare gli endemismi microbici del suolo, introducendo attraverso le deiezioni animali differenti filogruppi di specie preesistenti con effetti sulla ripartizione delle nicchie ecologiche (Nandakafle et al., 2017).

Il pascolamento può alterare direttamente la composizione floristica, modificando la produzione primaria netta degli ecosistemi prativi. L'intensità del pascolamento, in relazione ai fattori ambientali locali come temperatura e precipitazioni, può incrementare il contenuto di carbonio radicale, un fattore primario nella formazione di SOC. Il sovrapascolamento tuttavia può causare la perdita del topsoil fertile, degradando il suolo e tutto l'ecosistema. Le relazioni tra pascolamento e caratteristiche ecosistemiche, tra cui quelle pedologiche, tuttavia non hanno generalmente andamenti lineari. Questo perché gli effetti legati a questo processo naturale interagiscono con altri fattori, quali la profondità del suolo, le specie presenti, le temperature locali, le condizioni climatiche e l'altitudine. La comprensione dell'impatto dell'intensità di pascolamento permetterebbe una gestione più sostenibile di elementi come carbonio e azoto, con ripercussioni positive sui cambiamenti climatici. Un marcato pascolamento può comportare un incremento di SOC nei sistemi prativi dominati da specie vegetali C4, ma un decremento in quelli con dominanza di C3, tipiche di ambienti temperati. Questo fenomeno troverebbe spiegazione nei caratteri delle specie C4, che appaiono maggiormente adattate al pascolamento grazie allo sviluppo di rizomi e organi di accumulo sotterranei, capaci di rispondere efficacemente alla defogliazione da parte degli erbivori. Inoltre, negli ambienti dominati da piante C4, tipicamente tropicali, le temperature più elevate favoriscono l'attività microbica dei decompositori, facilitando il riciclo di carbonio e incrementando così il SOC (Abdalla et al., 2018).

Il pascolamento può stimolare lo sviluppo dei pascoli, sebbene occorra considerare che ad elevate intensità il carbonio consumato sia maggiore di quello reimpresso attraverso feci e urine. In condizioni naturali, tuttavia, il bilancio di carbonio legato al pascolamento è tendenzialmente stazionario. La qualità delle deiezioni animali, inoltre, può contribuire al mantenimento degli ecosistemi prativi. Un'elevata intensità di pascolamento può contribuire alla dominanza di specie vegetali incapaci di produrre una lettiera di elevata qualità necessaria al mantenimento della fauna e delle comunità

microbiche del suolo. Questo può comportare l'alterazione delle proprietà chimiche del carbonio organico stoccato nel suolo, oltre che modificare il rapporto tra funghi e batteri nella matrice. I funghi, per esempio, tendono a essere più tolleranti alle variazioni di umidità nel suolo rispetto ai batteri, pertanto la prima categoria di microrganismi tende a essere favorita da un'elevata intensità di pascolamento, specie in regioni aride o semiaride. La variazione nel rapporto tra funghi e batteri può causare un diretto cambiamento nella diversità microbica funzionale, legata ai cicli biogeochimici. Questa alterazione inoltre può essere favorita dall'incremento di azoto, rilasciato attraverso le deiezioni animali, e dal compattamento del suolo post calpestamento, che ne riduce il contenuto di umidità (Abdalla et al., 2018).

La tipologia climatica, l'intensità e il tipo di pascolamento in funzione alle specie allevate e selvatiche, il tipo di piante presenti, se C3 o C4, e le caratteristiche pedologiche influenzano direttamente gli effetti ambientali della pratica zootecnica. Gli effetti a livello ecosistemico, legati al pascolamento, possono essere positivi, rendendo le praterie degli hotspot di biodiversità e dei sink di carbonio, o negativi, incrementando le emissioni di gas serra. In definitiva appare chiaro che il tipo di gestione, contestualizzata alle condizioni abiotiche e biotiche locali, permettono di rendere il pascolamento una pratica sostenibile (Abdalla et al., 2018).

#### Principali razze allevate delle aree di studio

Le vacche al pascolo nei siti italiani considerati appartengono principalmente alle razze *Pezzata Rossa*, *Grigio Alpina* e *Bruna Italiana*, tuttavia sono presenti anche alcuni capi appartenenti alla razza *Frisona*.

La razza *Bruna Italiana* deriva da un ceppo svizzero a duplice attitudine (latte-carne) o triplice (latte-carne-lavoro), noto come *Bruna Alpina*. La forte concorrenza con la *Frisona* e la specializzazione produttiva della zootecnia italiana ha portato alla selezione produttivistica di questa razza, rendendola specializzata da latte grazie alla



Figure 1 *Bruna italiana* - *Bos taurus*

sostituzione del ceppo svizzero originario con quello americano (Brown Swiss). La produttività della *Bruna* non raggiunge quella della *Frisona*, ma in termini qualitativi il suo latte risulta superiore con una maggior vocazione ad una trasformazione casearia di

qualità. Il latte infatti presenta elevati tenori percentuali di grassi e di proteine, tra cui un'elevata frequenza di varianti genetiche favorevoli alla caseificazione, come l'allele B della k-caseina. La Bruna presenta una buona rusticità grazie alla sua capacità di adattamento a condizioni di allevamento difficili, come quelle che si possono riscontrare durante l'alpeggio. La carriera produttiva risulta essere abbastanza lunga, anche se ridotta rispetto al passato. Morfologicamente la Bruna italiana si avvicina alla Frisona a causa della forte selezione verso la produzione da latte, presentandosi più pesante, più alta e fine, ma meno muscolosa rispetto al ceppo originario europeo. Il mantello è solitamente bruno ma può variare nelle tonalità; gli unghioni, le corna e la cute sono pigmentati.

La razza *Pezzata Rossa Italiana* è a duplice attitudine bilanciata, il che la rende specializzata per la produzione sia di latte che di carne. Ha origini svizzere, dalla Valle del Simme, ma attualmente in Italia si allevano ceppi provenienti dall'Austria e dalla Germania. Ha una taglia medio-alta e un peso elevato, grazie anche alla sua muscolatura e la sua



Figure 2 Pezzata rossa - *Bos taurus*

natura grossolana, con l'ossatura grossa, la testa pesante e la pelle spessa. Il mantello si presenta pezzato rosso e il carattere fenotipico della "faccia bianca". Gli unghioni e le corna sono depigmentati, tendenti al giallastro. Questa razza presenta una longevità piuttosto ridotta a causa di scelte manageriali degli allevatori, ma non per caratteristiche genetiche. Infatti, solitamente è attuata la rimonta volontaria con l'allevamento di questa razza a causa dell'elevato valore della carne delle vacche a fine carriera. La produzione del latte negli ultimi anni è aumentata, mantenendo eccellenti livelli qualitativi con incidenze dell'allele B della k-caseina intermedia tra la Frisona e la Bruna.

La *Grigio Alpina* è una razza tipica dell'arco alpino con una mole ridotta, una buona longevità e un'ottima rusticità, rendendola adatta ai pascoli montani. È presente soprattutto in Trentino, dove è allevata come vacca da latte grazie alla qualità di questo. Il latte viene usato sia per il consumo diretto che per la produzione casearia, grazie alle ottime



Figure 3 Grigio alpina - *Bos taurus*

percentuali proteiche e lipidiche derivate dal genotipo delle frazioni proteiche k-caseina

e  $\beta$ -lattoglobulina. Il mantello è tipicamente grigio su una cute pigmentata, mentre gli unghioni e le corna sono neri.

La razza *Frisona italiana* rappresenta la maggior parte dei capi allevati per la produzione di latte in Italia. Il ceppo olandese originario nel tempo è stato sostituito con quello canadese (Canadian Holstein) e statunitense (Holstein Friesian). È una razza cosmopolita, allevata in tutto il mondo e specializzata nella produzione di latte dalle caratteristiche vitali mediocri, fatta eccezione per la precocità piuttosto pronunciata. La ridotta longevità, fertilità e rusticità derivano sia da fattori genetici intrinseci ma soprattutto dal marcato stress metabolico a cui sono sottoposti questi animali al fine di massimizzare la produzione. Queste vacche sono caratterizzate da una grande taglia e da un notevole peso medio, nonostante siano angolose e dalla scarsa muscolatura. La quasi assenza della giogaia, la pelle fine, la testa esile e l'ossatura leggera rendono la sua costituzione fine. Il manto è pezzato nero su cute pigmentata con gli unghioni e le corna nere. La qualità del latte è mediocre con un valore economico inferiore alla media per via delle ridotte percentuali di grasso e proteine, specie tra le caseine. La limitata qualità tuttavia è compensata dall'elevata produzione, capace di migliorare la redditività del singolo allevatore.



## Materiali e Metodi

### Siti di Indagine

Per il seguente lavoro di tesi sono stati selezionati tre diversi pascoli in Italia, uno di pianura e gli altri due di montagna. Il pascolo di pianura corrisponde a quello dell’Azienda Agraria Sperimentale dell’Università di Padova a Legnaro, mentre quelli montani sono situati uno in Val Ombretta (Malga Ombretta) e l’altro in località Passo Rolle (Malga Juribello). Sono stati prelevati inoltre dei campioni dall’area di Panchase e dal Chitwan in Nepal, durante la International Winter School “Biodiversity, Ethnoecology and Bioprospecting in Nepal Himalaya”. Ogni sito è stato identificato con una specifica sigla a cui è stato accostato il numero delle tre repliche. La seguente tabella associa le singole sigle con il nome di ogni sito per ciascuna area, usati nel lavoro di tesi.

*Tabella 1 Sigle dei Siti di Studio divise per Aree*

B	Bianco	Pascolo di Malga Ombretta
PE	Pale	
AB	Abbeveratoio	
FV	Fondo Valle	
M	Malga	
P3	Prato 3	
PT	Palot	
VP	Val Prima	
SES	Seslerieto	Pascolo di Malga Juribello
RUM	Rumiceto	
POE I	Poion I	
POE II	Poion II	
NP	Nardion	
ROD	Rhododendron-Vacciniunion	
VP J	Area con Vacche al pascolo	Pascolo dell’Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" - Agripolis
P1	Pascolo 1	
P2	Pascolo 2	
P3	Pascolo 3	
P4	Pascolo 4	
P5	Pascolo 5	
P6	Pascolo 6	
P7	Pascolo 7	
PS	Pascolo presso scolina	Siti del Nepal
N1	Pascolo nepalese 1 (Panchase)	
N2	Pascolo nepalese 2 (Panchase)	
FP	Foresta di Panchase	
CH	Prateria del Chitwan	

## Siti Nepalesi

I siti nepalesi appartengono a due regioni differenti: una a Panchase, un'area montuosa tra Pokhara e l'Annapurna, e l'altra al Chitwan, vicino al confine con l'India. I siti nella regione di Panchase corrispondono a una foresta e a due pascoli, destinati a caprini e bufali allevati localmente. I campioni provenienti da questi siti sono stati utilizzati solo come confronto addizionale.

Il sito in Chitwan, nello specifico a Sauraha, corrisponde a una prateria del Parco Nazionale del Chitwan, pascolata continuamente sia da poligastrici, come il bisonte indiano (*Bos gaurus*), e sia da monogastrici, come il rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*), oltre che da animali allevati localmente tra cui zebù. Le praterie del parco sono soggette a sfalci, al



Figure 4 Prateria del Chitwan

pascolamento di animali allevati e a incendi controllati al fine di controllarne le successioni ecologiche. Le praterie presentano circa 70 specie erbacee in media, tra cui alcune appartenenti al genere *Saccharum sp.*, tra la famiglia delle Poaceae, capaci di arrivare ad altezze anche di 7-8 metri (Jha et al., 1994).



Figure 5 Zebù allevata presso la regione del Chitwan



Figure 6 Rinoceronte indiano - *Rhinoceros unicornis*

La montagna di Panchase invece si trova nel centro del Nepal, tra le latitudini 28,2 ° e 28,3 ° N e le longitudini 83,75 ° e 83,95 ° E. Il suo picco è 2517 metri sul livello del mare e nell'area sono presenti due diversi tipi di climi: quello subtropicale alle basse quote e umido-temperato sopra i 2000 metri. La presenza di questi due climi diversi supporta una grande varietà di ecosistemi, come foreste, aree arbustive, zone umide, pascoli e campi agricoli. Ci sono diversi tipi di foresta nell'area di Panchase: quella predominante di Sal (*Shorea robusta*), quella di Schima-Castanopsis, quella di ontani,

quelle di querce temperate e le laurisilva subtropicali. Questa diversità di ecosistemi comporta una significativa diversità di specie, che ha portato la foresta a diventare un'area protetta dal governo nepalese nel 2012. Tra la fauna locale si ritrovano predatori come il leopardo comune (*Panthera pardus*), l'orso tibetano (*Ursus thibetanus*), e anche tre diverse specie di macaca e nibbio bruno (*Milvus migrans*). Tutte queste specie hanno un impatto sul bestiame locale, sulle colture e talvolta sulla popolazione locale. Le predazioni del bestiame, i saccheggi e gli attacchi agli uomini sono i principali tipi di impatti della fauna selvatica nell'area alle popolazioni locali. Nonostante ciò, i locali proteggono l'area, in particolar modo la foresta in quanto fonte di numerose risorse, e la caccia è una pratica illegale a livello locale. Questo può essere un limite per la gestione degli impatti della fauna selvatica, ma dall'altra parte, può promuovere la conservazione della stessa. Le piante selvatiche sono largamente usate localmente per molti



Figure 4 Pascolo della regione di Panchase

scopi e sono considerate risorse preziose dalle popolazioni locali. Nell'area di Panchase, si trovano specie vegetali, tra cui alcune rare, minacciate ed endemiche: vi sono 593 specie, tra cui 124 specie di orchidee, come la *Pleione humilis*. Tutta la biodiversità vegetale localmente fornisce molti servizi e beni; le popolazioni locali mantengono una profonda conoscenza riguardo l'uso delle piante, a cui sono legate diverse tradizioni. Usano piante selvatiche per controllare i parassiti, per fabbricare utensili, per colorare i vestiti, per nutrire gli animali, in cucina e medicina. Nella foresta di Panchase, sono note esserci 45 specie di piante medicinali, appartenenti a 32 famiglie e sotto 44 generi (Bhattarai et al., 2011). Nell'area il sistema agricolo risulta essere fortemente a carattere di sussistenza e le interazioni tra l'uomo e l'ecosistema sono molto marcate. I pascoli vengono usati solo durante il periodo estivo e il carico del bestiame è ridotto. Localmente vengono allevati bufali e capre, che sono soggette alla predazione della fauna selvatica. I campioni in questa area rappresentano sia dei pascoli durante il periodo in assenza di carico e sia l'interno



Figure 5 Foresta di Sal di Panchase

della foresta, quindi un substrato caratterizzato da una pronunciata lettiera di piante subtropicali come la *Shorea robusta*.



Figura 9 Area di Campionamento del Chitwan - Nepal

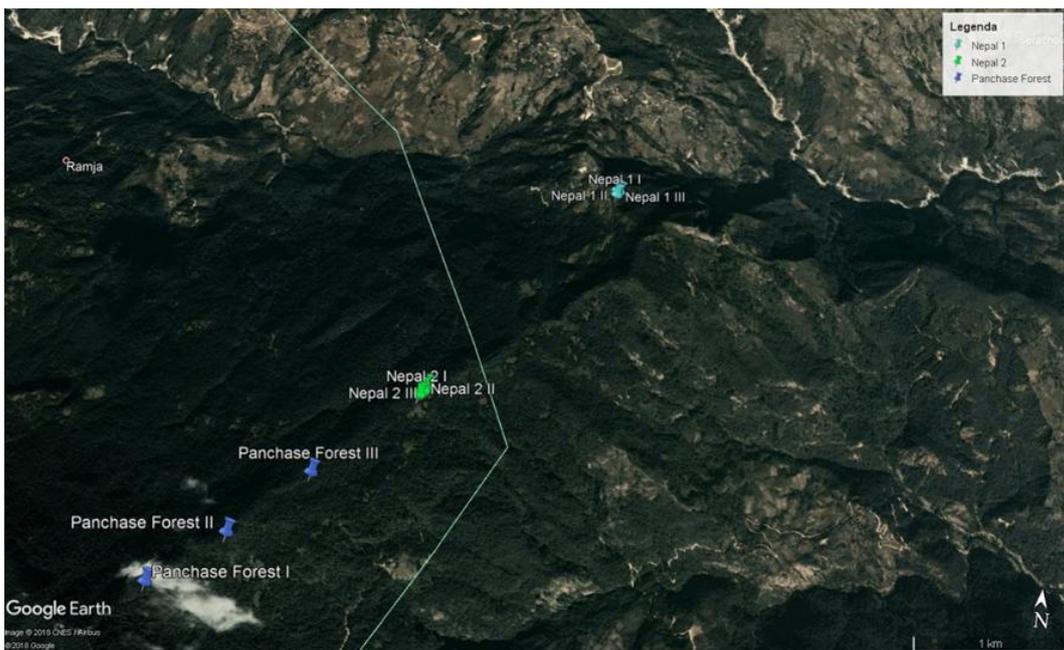


Figura 10 Area di Campionamento di Panchase - Nepal

Sito: pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo"

Il pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova a Legnaro è caratterizzato da un suolo franco-argilloso, sub-basico, ricco in calcare, mediamente dotato di azoto e di potassio scambiabile, ma ricco di fosforo. La superficie del pascolo si presenta pianeggiante con la falda freatica profonda 1.5-1.7 m nel periodo tra luglio-agosto e tra 0.4-0.8 m in quello invernale. Il suolo è a 6-7 metri sul livello del mare. Il prato è stato costituito nel 1982 con il seguente miscuglio di semi: *Dactylis glomerata* L. 27%, *Festuca arundinacea* L. 25%, *Lolium multiflorum* L. 8%, *Lolium perenne* L. 20%, *Lotus corniculatus* L. 10%, *Trifolium repens* L. 4% e *Trifolium pratense* L. 6%. La composizione floristica vede una prevalenza di graminacee e una buona presenza di fabacee. Dalle 7 specie introdotte con la semina iniziale, il prato adibito a pascolo attualmente ne presenta circa 26 di diverse famiglie. La composizione floristica è influenzata dalle variazioni di carichi d'azoto e dalla frequenza e tipo dei tagli effettuati. La presenza di tagli rasi e frequenti, uniti a una buona concimazione, favorisce le graminacee; l'assenza di una concimazione azotata invece favorisce la presenza delle leguminose (Ziliotto et al., 1996). La produzione di biomassa vegetale localmente inoltre risente degli andamenti meteorologici secchi. Il pascolo è di tipo permanente, infatti vi pascolano equini durante tutto l'anno e in estate anche Pezzate Rosse.

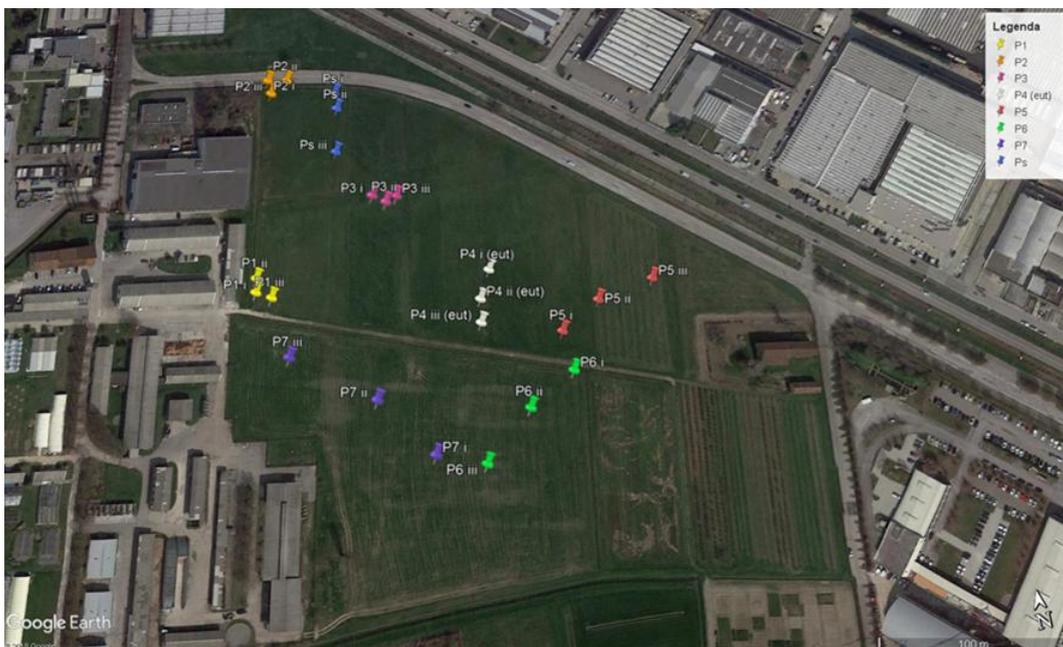


Figura 11 Area di Campionamento del Pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo"- Italia

Sito: pascolo di Malga Ombretta

Il pascolo di Malga Ombretta è situato nell'omonima valle dietro la Marmolada, tra i 1900 e i 2100 metri sul livello del mare. È una valle caratterizzata da un'importante biodiversità vegetale, caratterizzata da una flora con specie rare. L'alpeggio presenta zone a solo copertura erbacea e altre con presenza di piante arboree. Vi si possono distinguere diverse macrozone dal punto di vista floristico, che testimoniano l'eterogeneità della valle nelle sue caratteristiche. In prossimità della malga si ritrova un prato pingue a forte presenza di specie nitrofile come la Canapetta screziata (*Galeopsis speciosa* Mill.) e l'Ortica (*Urtica dioica* L.). Il prato subito al di sopra della malga, invece, risulta essere povero in graminacee e tendenzialmente più xerico. Questa tipologia con l'aumento di quota lascia il posto a un prato su suolo poco profondo e ricco in graminacee, tra cui predominano la *Festuca rubra* e la *Festuca violacea* Gaudin, accompagnate da *Agrostis stolonifera* L. e *Sesleria varia*. Salendo ulteriormente di quota segue il pascolo arborato con le rinnovazioni di *Picea excelsa* (Lam.) Link e *Larix decidua* Miller. Oltre il pascolo arborato, alle massime quote della valle, si ritrova un prato ricco graminacee e in specie, tra cui il giglio martagone (*Lilium martagon* L.), la nigritella nera (*Nigritella nigra* (L.) Rchb. f.), quella rossa (*Nigritella rubra* (Wettst.) K.Richt.) e l'orchide dei pascoli (*Traunsteinera globosa* L.). Nella parte più pianeggiante della valle, alle quote più basse, il pascolo è dominato da *Sesleria varia* (Jacq.) Wettst., accompagnata da *Poa alpina* L., *Plantago media* L. e *Ranunculus montanus* Willd.. Lungo i ghiaioni, nella zona più bassa vicino al torrente Ombretta e sui versanti a pendenza maggiore, la specie predominante è ancora *S. varia*, accompagnata da *Festuca rubra* L. e importanti percentuali di *Tussilago farfara* L. e *Petasites albus* (L.) Gaertn. Sono presenti anche parcelle di bosco di *L. decidua* e *P. excelsa* affermate, con il sottobosco costituito da *S. varia* e *P. alpina*, accompagnate da specie tipiche di bosco. Il suolo è classificato come Leptosol, quindi è caratterizzato da profili sottili con un elevato contenuto di sostanza organica in superficie, una media tessitura e un abbondante scheletro. Il pH del suolo è tendenzialmente basico grazie alla natura fortemente calcarea, derivato dal materiale parentale dolomitico, e il drenaggio è moderatamente rapido. L'allevamento presente è costituito da un ridotto numero di capi, appartenenti alle razze Pezzate rosse e Grigio alpine. Il pascolamento nell'area è presente solo durante il periodo estivo a causa delle condizioni climatiche locali e si concentra soprattutto a fondo valle, a causa delle pronunciate pendenze. Nella

valle sono presenti sia camosci e sia stambecchi che praticano un pascolamento di diversa intensità rispetto a quello bovino e in aree a pendenza più pronunciata. Tra i vari fattori d'impatto occorre considerare anche il flusso turistico durante il periodo estivo.



*Figure 12 Grigio alpina al pascolo - Malga Ombretta*



*Figure 13 Pezzate rosse al pascolo - Malga Ombretta*



*Figure 14 Prato 3 - Malga Ombretta (Post)*



*Figure 15 Malga - Malga Ombretta (Post)*



*Figure 16 Traunsteinera globosa*



*Figure 17 Galeopsis speciosa*



*Figure 18 Nigritella rubra*



*Figure 19 Prato 3 - Malga Ombretta (Pre)*

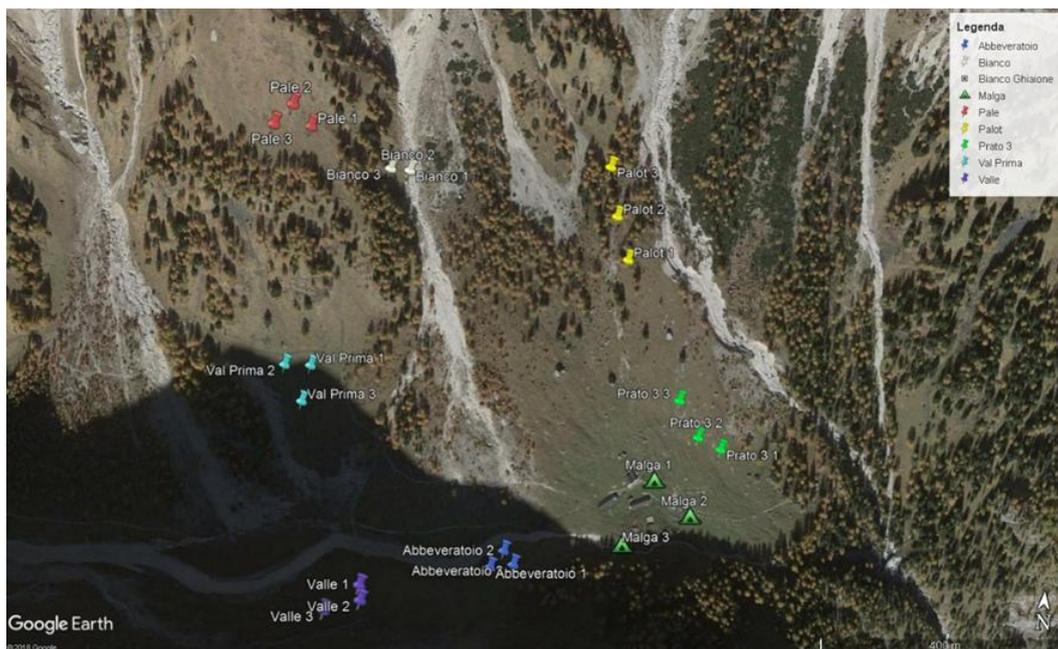


Figure 20 Area di Campionamento del Pascolo di Malga Ombretta - Italia

#### Sito: pascolo di Malga Juribello

Il pascolo di Malga Juribello è situato in località del Passo Rolle, tra i 1800 e i 2000 metri sul mare. La Malga Juribello è di tipo sperimentale e di proprietà della Provincia Autonoma di Trento, gestita dalla Federazione Provinciale Allevatori e presenta 150 vacche da latte durante il periodo estivo. Il pascolo è caratterizzato da una buona



Figure 21 Brune al pascolo - Malga Juribello

diversità vegetale con diverse alleanze fitosociologiche, nonostante sia a solo copertura erbacea. Tra le varie alleanze nell'area campionata si ritrovano un Rumicion alpini in prossimità della malga, un Rhododendron-Vaccinienion e un Seslerion albicantis alle quote più alte, un Nardion e un Poion alpinae/Nardion, invece largamente distribuiti. Al di fuori dell'area campionata vi sono anche un Caricion nigrae e un Poion alpinae puro. Grazie a questa diversità vegetale nell'area si ritrovano svariati tipi di pascoli: quelli pingui riconducibili ai Poion, quelli magri su suoli alcalini o neutri riconducibili ai Seslerion e infine quelli magri su suoli acidi riconducibili ai Nardion. Ad indicare la

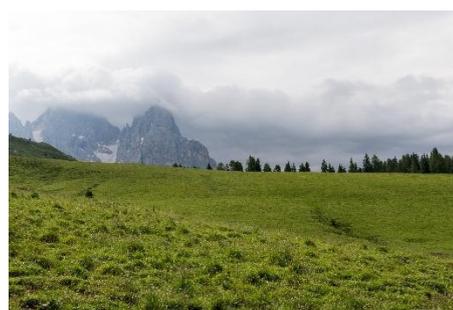


Figure 22 Pascolo di Malga Juribello

buona biodiversità vegetale, all'interno del pascolo sono state ritrovate molteplici specie di orchidee, come il celoglosso verde (*Coeloglossum viride* (L.) Hartm.), la nigritella nera (*Nigritella nigra* (L.) Rchb. f.), la manina rosea (*Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br.), la concordia (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) e l'orchide maschia (*Orchis mascula* L.). Il suolo per la maggior parte dell'area è classificato come un Podzol, quindi è caratterizzato da un pH acido, una buona differenziazione degli orizzonti e una buona profondità (70-100 cm). La presenza nell'area del rododendro rosso (*Rhododendron ferrugineum* L.) testimonia l'acidità del suolo (Spohn M. e Spohn R, 2014). La tipologia di suolo è riconducibile al clima piovoso della zona, dovuto ai venti umidi provenienti dalla pianura veneta che condensano contro il gruppo montuoso delle Pale generando locali precipitazioni. Queste inducono localmente fenomeni di eluviazione e illuviazione della sostanza organica e sesquiossidi di ferro lungo il profilo pedologico, formando gli orizzonti tipici dei Podzol (Bianchi et al., 2009). Nell'area sono presenti capi di Pezzate rosse e Brune, ma si possono ritrovare anche Frisone. Il pascolamento nell'area è distribuito in modo abbastanza omogeneo grazie a pendenze poco pronunciate. Nell'area sono presenti anche erbivori selvatici al pascolo come cervi e durante il periodo estivo vi è un notevole afflusso di turisti.



Figure 23 *Dactylorhiza maculata*



Figure 24 *Nigritella nigra*



Figure 25 *Coeloglossum viride*

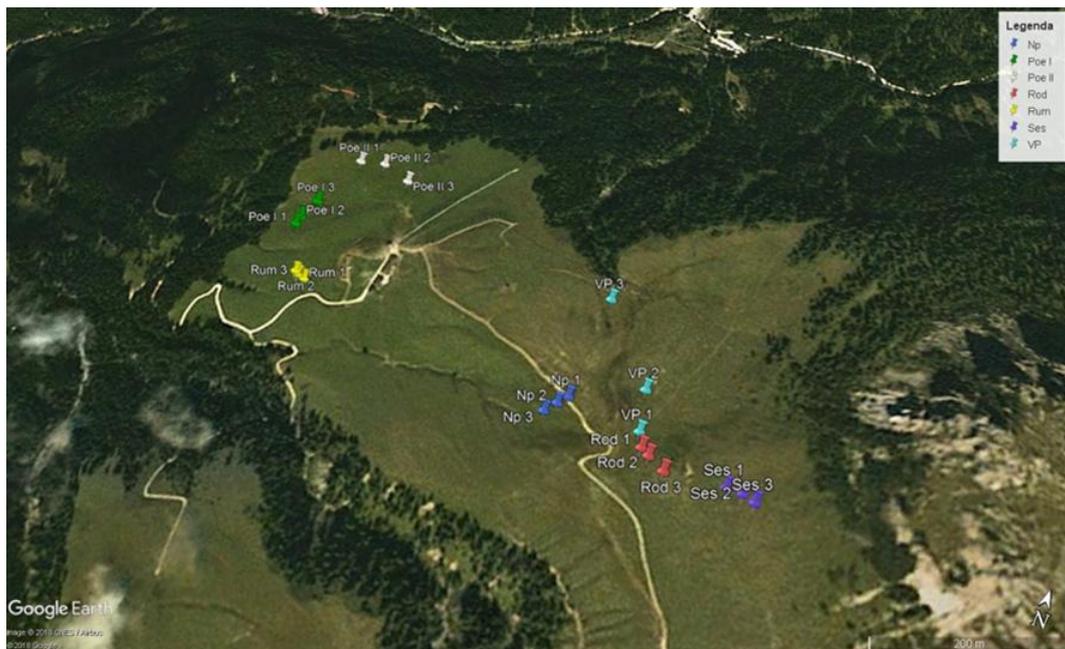


Figura 26 Area di Campionamento del Pascolo di Malga Juribello - Italia

### Procedure di Campionamento, Estrazione, Purificazione e Amplificazione del DNA del suolo

L'intero lavoro di tesi verte sull'analisi del DNA tratto da campioni di suolo prelevati da molteplici aree, anche diverse da pascoli. Tra le aree considerate ce ne sono 4 nepalesi, raccolti durante l'International Winter School in Nepal e appartenenti a pascoli, foreste e praterie. Le aree in Italia corrispondono a tre pascoli: due alpini, uno in Val Ombretta e uno a Passo Rolle, e uno di pianura presso l'Azienda Agricola Sperimentale di Agripolis. In ogni area sono stati identificati molteplici siti, dove sono state effettuate tre repliche.

Il campionamento primario è stato eseguito in campo con un carotatore, prelevando i primi 10 cm di suolo, interessando quindi il topsoil, e rimuovendo il cotico e i residui vegetali. Ad ogni prelievo il suolo è stato introdotto in una provetta falcon da 50 ml, siglato e sono state determinate le coordinate geografiche con l'ausilio del GPS (Garmin mod 73). Le coordinate sono state successivamente visualizzate e salvate con l'ausilio del programma Google Earth Pro al fine di verificare anche la corretta posizione.

I campioni raccolti sono stati essiccati, lasciandoli due settimane a contatto con l'aria per rimuovere l'acqua, in singoli contenitori aperti per evitare contaminazioni. In seguito all'essiccazione le masse di suolo sono state triturate con un mortaio e setacciate

con una maglia da 500 micron per ridurre la tessitura. Al fine di evitare contaminazione tra i singoli campioni, ad ogni pestellatura si sono puliti il mortaio e il pestello con della carta assorbente monouso, bagnata con dell'etanolo al 96%. Durante la pestellatura sono stati rimossi i residui grossolani vegetali, come radici o pezzi di fusto, e rocce. Il campione lavorato è infine stato reintrodotta nella falcon d'appartenenza siglata. Questa operazione ha permesso di ridurre il volume del suolo, agevolando la successiva estrazione del DNA. La pestellatura, infatti, aumenta la superficie specifica del suolo incrementando l'efficacia dei singoli reagenti. Inoltre, la riduzione di tessitura disgrega la componente umica, che durante l'estrazione compete con il DNA riducendo l'efficacia del processo.

Alla preparazione del campione è seguito il campionamento secondario: dai campioni di suolo pestellati sono stati successivamente pesati 0.4 g di materiale con una bilancia di precisione e inseriti in una microprovetta in propilene eppendorf da 1,5 ml, siglata. Dopo ogni pesata la spatolina utilizzata è stata pulita con della carta monouso imbevuta di etanolo al 96% al fine di ridurre la contaminazione tra i vari campioni.

L'estrazione di DNA è basata su approccio diretto, ossia sulla lisi delle cellule direttamente in una porzione di suolo e la successiva estrazione dal campione (Töwe et al., 2011). Questa stata effettuata tramite l'aggiunta di 1 mL di NaP, come buffer estraente, insieme a due varianti di biglie in ceramica con due differenti diametri. Le biglie sono servite per facilitare la lisi delle cellule, che è stata omogenizzata attraverso l'uso del TissueLyser II. Questo strumento è in grado di applicare oscillazioni ad alta frequenza ai campioni per omogenizzarli durante la lisi. Si è impostato lo strumento con una frequenza di oscillazioni a 30 Hz per 4 minuti; al fine di migliorare la resa di estrazione, i campioni sono stati invertiti durante la lisi. L'inversione risulta essere necessaria in quanto i campioni più esterni sono più soggetti alle oscillazioni rispetto a quelli interni dentro allo strumento. All'estrazione a crudo del DNA è seguita la centrifugazione per separare la fase solida da quella liquida e, successivamente, si è passati alla purificazione dell'estratto.

La purificazione del DNA è stata effettuata con il sistema automatizzato Biosprint attraverso la preparazione delle 6 piastre necessarie. La prima piastra è stata preparata per ogni singolo pozzetto con 200  $\mu$ L di isopropanolo, 200  $\mu$ L di RLT (buffer estraente), 200  $\mu$ L del campione surnatante 25  $\mu$ L di MagAttract. Quest'ultimo è una soluzione di microbiglie in silicio che si legano al DNA e successivamente ne permettono l'estrazione

da una matrice eterogena attraverso l'applicazione di un campo magnetico. La seconda piastra è invece stata preparata con 500 µL di buffer RPV, mentre sia la terza che la quarta piastra sono state preparate con 500 µL di Etanolo al 96%. La quinta piastra è stata preparata con 500 µL di TWEEN, un sapone diluito, mentre la sesta con 100 µL di acqua sterilizzata. La presenza di acqua permette la diluizione del campione di DNA estratto, riducendo così l'inibizione dovuta alla presenza di sostanze umiche. Queste sostanze derivano dalla matrice pedologica d'estrazione e sono capaci di competere nei legami con il DNA, inibendo i vari processi d'analisi, in particolare modo l'amplificazione attraverso PCR (Tiwe et al., 2011; Cavagnaro et al., 2007). Il DNA purificato è stato successivamente conservato in freezer a -20 °C per prevenire il suo deterioramento.

Al fine di quantificare i geni *amoA* e *nosZ* è stata attuata una PCR real-time a partire dai campioni di DNA purificato. Questi geni sono stati dimostrati essere dei marker affidabili per batteri e archea interessati nei processi di nitrificazione e denitrificazione (Zanardo et al., 2016). Per il gene *amoA* sono stati utilizzati due differenti tipi di primer, uno specifico per i batteri e l'altro per gli Archea. Ogni primer usato presenta due forme tra loro complementari: quella forward (F) e quella reverse (R). I primers usati corrispondono ai seguenti riportanti in tabella:

*Tabella 2 Primers usati nello studio*

<b><i>amoA Archea F</i></b>	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG
<b><i>amoA Archea R</i></b>	GCG GCC ATC CAT CTG TAT CT
<b><i>amoA Bacteria F</i></b>	GGGGTTTCTACTGGTGGT
<b><i>amoA Bacteria R</i></b>	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
<b><i>nosZ F</i></b>	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG
<b><i>nosZ R</i></b>	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA

Le singole lettere nei primers corrispondono alle sigle delle quattro basi azotate pirimidine, A e T, e purine, C e G. La sigla A sta per Adenina, T per Timina, C per citosina e G per guanina. Le lettere diverse dalle quattro sigle canoniche corrispondono a più possibili basi azotate nella sequenza secondo la nomenclatura IUPAC. La sigla Y sta per C o T, S per G o C, R per A o G, N per assenza di base e M per A o C.

Sono state usate delle piastre da 344 pozzetti con 3 repliche tecniche per ogni campione, al fine di escludere errori stocastici. Per ogni piastra sono stati inoltre effettuati tre controlli negativi con solo acqua. In ogni pozzetto sono stati inseriti 4 µL di mix, composta da: 2.5 µL di Master Mix SYBR, 0.15 µL di PF, 0.15 µL di PR e 1.2 µL di

acqua sterilizzata. I primers prima di essere aggiunti ai pozzetti sono stati diluiti in acqua sterilizzata in un rapporto 1:10 quindi sono stati aggiunti 45  $\mu\text{L}$  di acqua ogni 5  $\mu\text{L}$  di primer. In ogni pozzetto, eccetto nei tre di controllo, sono stati aggiunti 1  $\mu\text{L}$  per singolo campione di DNA, diluito in un rapporto 1:20 (3  $\mu\text{L}$  DNA e 57  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ ). Per caricare il DNA in ogni singolo pozzetto è stata usata una micropipetta con un puntale monouso al fine di ridurre al minimo le contaminazioni. Sulla piastra preparata è stata applicata una pellicola di plastica specifica al fine di evitare la perdita del contenuto l'evaporazione durante la corsa della PCR. Prima di avviare la qPCR, la piastra è stata inoltre centrifugata per rimuovere le eventuali bolle d'aria, che sarebbero andate a interferire durante rilevazione delle sonde a fluorescenza a causa del differente indice di rifrazione della matrice aeriforme rispetto quella liquida. La qPCR è stata eseguita attraverso un termociclatore impostando 95°C come temperatura di denaturazione, 57° C e 60°C per l'annealing per 1 minuto e 72° C per l'allungamento. La fase di denaturazione inizialmente, durante l'holding stage, ha avuto una durata di 10 minuti, ma successivamente di 15 secondi.

Attraverso la real-time PCR è possibile stimare la quantità di geni target indirettamente simultaneamente alla loro amplificazione. Questo tipo di PCR è ampiamente usata per quantificare il numero di molecole sia di RNA che di DNA. La quantificazione avviene per mezzo della rilevazione della fluorescenza sviluppata dai marker fluorescenti, noti anche come sonde o probes, legati ai geni target. I marker fluorescenti sono i fluorocromi, che come agenti intercalanti si legano durante l'annealing ai geni ed emettono fotoni durante l'allungamento. Il segnale emesso è proporzionale all'amplificato e a fine di ogni ciclo la fluorescenza misurata attraverso un detector, uno spettrofluorimetro, permettendone la quantificazione. L'amplificazione del materiale genetico nella real-time PCR si basa sugli stessi principi teorici e pratici di una normale reazione a catena della polimerasi. Noti gli estremi della sequenza nucleotidica target, si selezionano i primers. Questi ibridano le estremità e attraverso la DNA polimerasi inizia l'amplificazione in tre fasi distinte: la denaturazione, l'appaiamento e la sintesi o elungazione. Durante la prima fase le temperature si assestano tra i 93 e i 95°C, portando alla denaturazione del DNA con l'apertura della doppia elica. Nella seconda fase la temperatura varia tra i 50 e i 70°C, in base alla composizione delle basi e alla natura dei primers, che si appaiono alle estremità 5' delle sequenze target. Nell'ultima fase la

polimerasi, partendo dai primers appaiati, inizia la sintesi della sequenza complementare secondo il verso 5' – 3', andando così a ripristinare la molecola di DNA a doppia elica. Le dimensioni di queste molecole di DNA, note anche come ampliconi, è dipendente dalla distanza presente tra i due primers. Le polimerasi utilizzate, come la *Taq*-polimerasi, sono termoresistenti perché derivano direttamente da microrganismi estremofili. Queste tre fasi sono ripetute più volte in cicli e il DNA neosintetizzato fungerà a sua volta da stampo durante lo sviluppo della PCR, che opera su una funzione logaritmica. In via teorica ad ogni ciclo il numero di geni target dovrebbe raddoppiare. Si può quindi stimare dalla quantità finale quella iniziale basandosi sul principio teorico di funzionamento della PCR.

Nota la quantità finale quindi si può stimare quella iniziale poiché gli ampliconi finali sono direttamente proporzionali alle copie di partenza. La rilevazione della fluorescenza da parte del detector inoltre fornisce informazioni riguardo la quantità iniziale di geni target presenti: maggiore essa è, e minore è il numero di cicli necessari alla rilevazione. Il ciclo minimo a cui è rilevabile la fluorescenza è detto ciclo soglia (threshold cycle - Ct) e a partire da questo si ha la fase a crescita logaritmica (Sims, Atreyee, et al. – 2012). Il confronto dei cicli soglia per ogni campione permette il confronto e la successiva quantificazione relativa. Questo tipo di quantificazione si basa sul confronto tra i vari cicli soglia dei singoli campioni e i controlli endogeni, ma non su standard. La quantificazione di una real-time PCR basata su standard a concentrazioni note è detta assoluta e utilizza curve standard per stimare la quantità di partenza. I dati ottenuti dalla real-time PCR corrispondono ai cicli soglia (Ct): minore è il loro numero e maggiore è la quantità di DNA di partenza.

## Risultati e Discussione

L'analisi dei dati, ottenuti attraverso la tecnica della real-time PCR, sono state effettuate con l'ausilio di Excel, software del pacchetto office 365, e PAST 3.2, un software open source distribuito dal Natural History Museum e l'Università di Oslo.

I dati analizzati derivano da campionamenti effettuati in due periodi differenti per quanto riguarda le aree di Malga Ombretta e Juribello. Per quanto riguarda i campionamenti in assenza di monticazione sono stati effettuati in data 31/10/2017 in Malga Ombretta e 14/06/2018 in quella di Juribello. I campionamenti durante la monticazione sono stati invece effettuati il 14/07/2018 a Malga Ombretta e 05/07/2018 a Juribello. Occorre evidenziare che i periodi di campionamento in assenza di monticazione tra le due malghe sono diversi. Il campionamento nel pascolo di Agripolis è stato effettuato il 23/01/2018 mentre quelli in Nepal sono stati raccolti in due momenti separati: il 04/02/2018 a Panchase e il 10/02/2018 a Chitwan.

I geni *amoA* all'interno dei grafici sono stati indicati attraverso delle sigle per semplificazione: *amoA A* sta per *amoA Archea*, *amo B* per *amoA bacteria*. I termini pre e post indicano invece, i due differenti periodi di campionamento rispetto la monticazione.

I dati ricavati dalla real-time PCR sono i Cicli soglia (Ct), che delineano l'inizio della fase logaritmica durante l'amplificazione e sono inversamente proporzionali al quantitativo di DNA presente nel campione. I cicli soglia sono stati trasformati in stime di copie di geni attraverso l'uso di curve di calibrazione, precedentemente ottenute (Sims et al., 2012; Zanardo et al., 2016). Le curve di calibrazione sono state sviluppate con Excel mettendo in relazione le copie di geni noti con il numero di cicli e successivamente si è ricavata la funzione. La scelta del tipo di funzione più coerente è stata basata sul confronto dei vari  $R^2$ , selezionando quella con i valori maggiori. Questa procedura è stata eseguita per i tre diversi geni selezionati nello studio come marker funzionali. Ogni gene pertanto presenta una propria curva di calibrazione e funzione. Per quanto concerne i geni *nosZ* e *amoA Batterico* le funzioni sono di tipo esponenziale, mentre per quello *amoA Archea* è una potenza con base diversa da e. Le funzioni esponenziali pongono la variabile all'esponente mentre le potenze essa è posta alla base. Come si evince dalle curve di calibrazione la relazione tra cicli e copie di geni è inversamente proporzionale pertanto maggiore sarà il numero di ciclo e minore sarà la quantità del gene target.

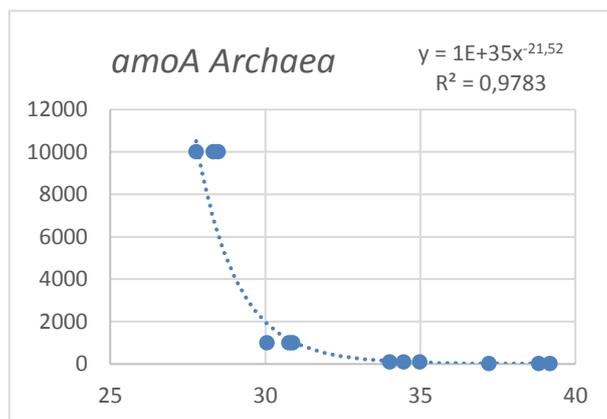


Figura 27 Curva di calibrazione con funzione annessa - *amoA* Archaea

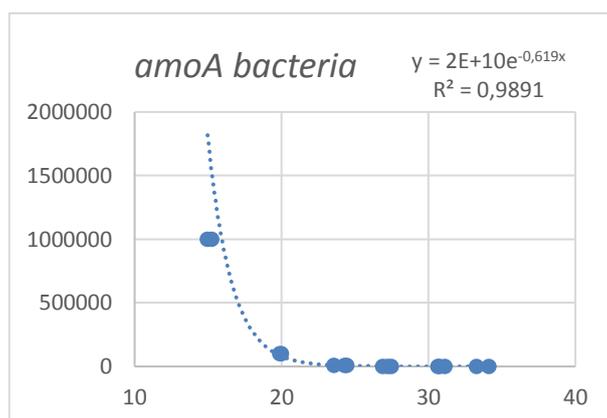


Figura 28 Curva di calibrazione con funzione annessa - *amoA* bacteria

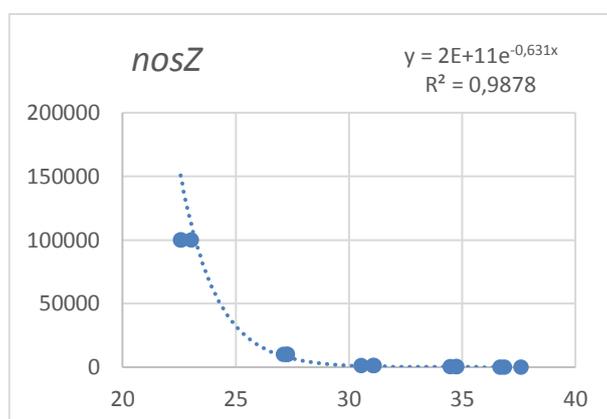


Figura 29 Curva di calibrazione con funzione annessa - *nosZ*

L'analisi dati è stata effettuata utilizzando le stime delle copie dei geni, che a differenza dei cicli soglia corrispondono a quantità intere non logaritmiche. L'applicazione del test di Shapiro-Wilk ha permesso di confermare l'ipotesi di non

normalità dei dati al livello di significatività del 5% o 0,05, pertanto l'analisi condotta sui dati utilizza test statistici non parametrici.

Tabella 3 Risultati dell'applicazione del test di Shapiro-Wilk

	<i>nosZ</i> pre monticazione	<i>nosZ</i> post monticazione	<i>amoA A</i> pre monticazione	<i>amoA A</i> post monticazione	<i>amoA B</i> pre monticazione	<i>amoA B</i> post monticazione
N	42	42	42	42	42	42
Shapiro-Wilk W	0,5362	0,7594	0,4473	0,3343	0,3442	0,3214
p(normal)	2,50E-10	6,70E-07	2,22E-11	1,46E-12	1,83E-12	1,09E-12

Nello specifico, con un livello di significatività imposto pari al 5% per il rigetto dell'ipotesi nulla di uguaglianza, i test usati sono stati:

- di Kruskal-Wallis o ANOVA non parametrica, usato per valutare l'uguaglianza delle diverse mediane tra gruppi;
- di Wilcoxon, usato per valutare la provenienza comune tra due campioni non indipendenti attraverso il confronto delle mediane;

Il test di Kruskal-Wallis è stato applicato per valutare le differenze tra i siti all'interno delle aree di Malga Juribello e Ombretta e il pascolo di Agripolis. Il test è stato applicato per i tre geni separatamente e il rapporto tra gli *amoA Archea* su quelli batterici. Il confronto è stato effettuato tra i gruppi all'interno dello stesso periodo al fine di evitare problemi di dipendenza. In presenza di significativa differenza tra gruppi, in seguito all'applicazione del test di Kruskal-Wallis, si è successivamente utilizzato il Test di confronto multiplo di Dunn. Questo test permette di identificare i gruppi tra loro diversi in maniera analoga a quello di Tukey-Kramer applicato nella situazione in cui l'ANOVA porta a rigettare l'ipotesi nulla di omogeneità. Il test di Kruskal-Wallis si basa sull'analisi dei ranghi, ossia delle posizioni rispetto le posizioni centrali, ed è l'equivalente di quello di Mann-Whitney U, che è applicabile solo tra due gruppi. I due test condividono le medesime assunzioni: i campioni dei gruppi devono essere casualmente estratti dalle corrispondenti popolazioni e la distribuzione delle variabili devono avere la stessa forma in ogni popolazione.

Il test di Wilcoxon è stato applicato per valutare l'uguaglianza in termini di mediana tra i campioni dello stesso sito e gene nei due periodi presi in esame, quelli pre e post monticazione nei pascoli di Malga Ombretta e Juribello. Il test non parametrico è stato scelto per la presenza di dipendenza dovuta al confronto di siti uguali nel tempo.

Sono state effettuate delle analisi multivariate per evidenziare le differenze tra i singoli siti e repliche per quanto riguarda i singoli geni. Nello specifico è stata effettuata l'analisi a componenti principale (PCA) e la cluster analysis producendo un dendrogramma del tipo neighbour joining utilizzando l'indice di distanza di Bray-Curtis al fine di minimizzare l'effetto dei valori nulli della matrice. Gli assi delle PCA sono stati selezionati sui valori di massima varianza spiegata.

La costruzione degli ortogrammi, usati per evidenziare le differenze negli andamenti tra i geni selezionati, si è basata su una trasformazione logaritmica in scala neperiana delle stime di copie di geni e delle devianze standard. La trasformazione si è resa necessaria per le marcate differenze nei valori numerici di copie, che non permetteva un chiaro confronto. Nel caso in cui il dato stimato sia nullo nel grafico viene riportato il valore 1.

Dagli ortogrammi si evince che per quanto concerne il gene *amoA* *bacteria* l'andamento pre e post monticazione varia a seconda del sito, sia in Malga Ombretta che Juribello. In generale si può notare un decremento nella maggior parte dei siti in entrambe le aree passando dal periodo in assenza di vacche al pascolo alla monticazione. I geni *nosZ* e *amoA* *Archea* invece mostrano un netto incremento in termini di copie di geni durante il periodo post monticazione nel pascolo di Malga Ombretta, mentre in quello di Juribello tornano ad avere un andamento in linea con l'*amoA* batterico, variando in base al sito e mantenendo per alcuni siti valori costanti nei due periodi. Le differenze tra le copie dei geni appaiono più marcate nel pascolo di Ombretta a differenza di Juribello. Questo può essere dovuto alle differenze nelle tempistiche dei periodi di campionamento tra le due aree, oltre alle differenze nelle morfologie, caratteristiche pedologiche, vegetazionali e faunistiche dei due pascoli. Il pascolo di malga Juribello ha un carico zootecnico maggiore rispetto a quello di Ombretta e inoltre è più facilmente accessibile, il che incrementa i fattori di disturbo sia naturali che antropici. Il rapporto tra *amoA* *Archea* su *amoA* *bacteria* invece mostra un andamento coerente con quello dei geni *amoA* *Archea* e *nosZ* nel pascolo di Malga Ombretta: vi è un incremento nel periodo di monticazione. Nel pascolo di Malga Juribello invece vi è un andamento superiore durante il periodo pre-monticazione e questo sembrerebbe mostrare come il pascolamento porti a un'omogeneizzazione nelle comunità microbiche nitrificanti, a differenza di Malga Ombretta dove avviene l'esatto opposto con un incremento degli Archea.

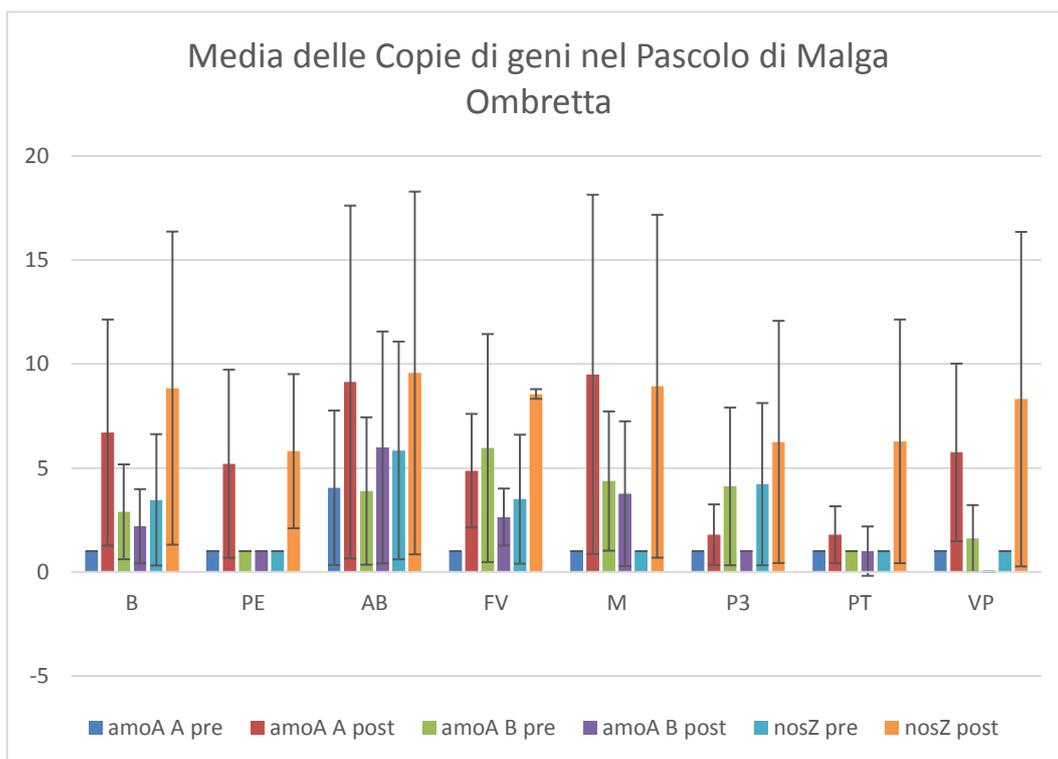


Figura 30 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Ombretta in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard

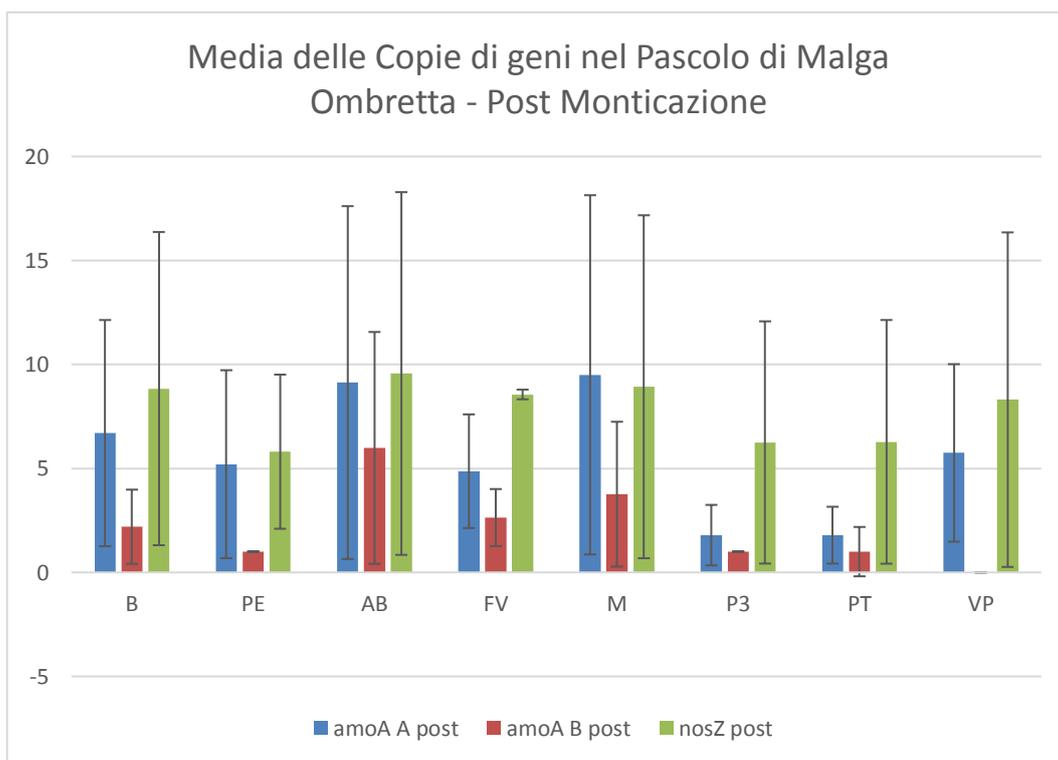


Figura 31 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Ombretta in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard - Post monticazione

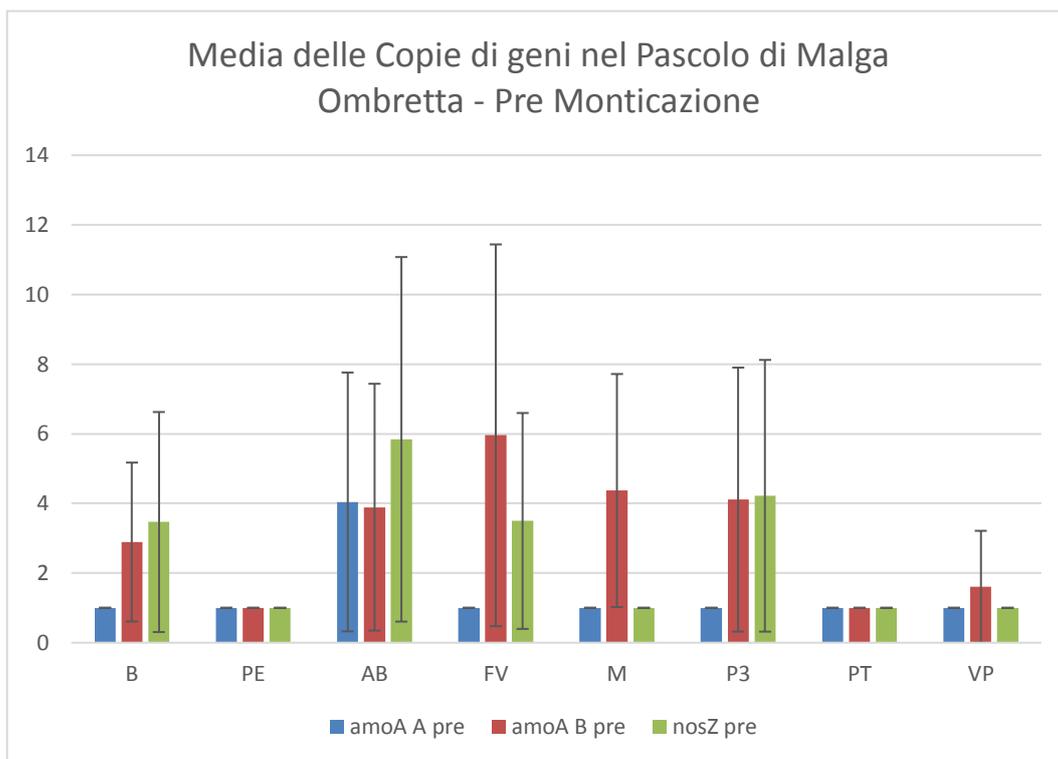


Figura 32 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Ombretta in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard - Pre monticazione

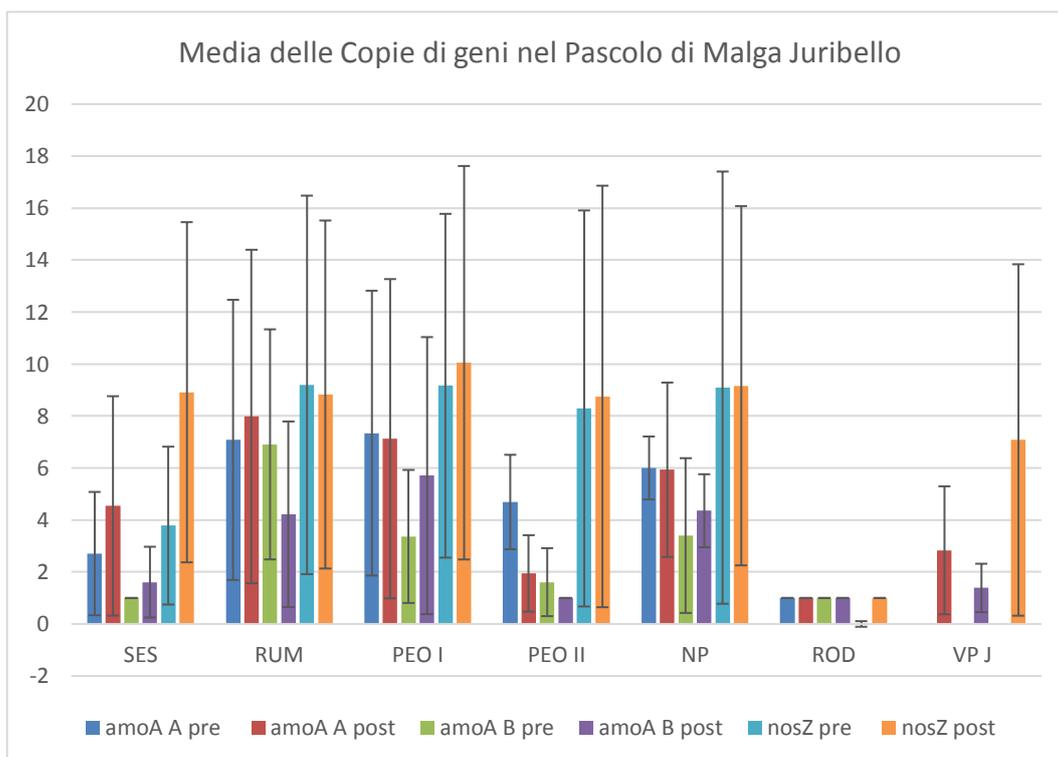


Figura 33 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Juribello in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard

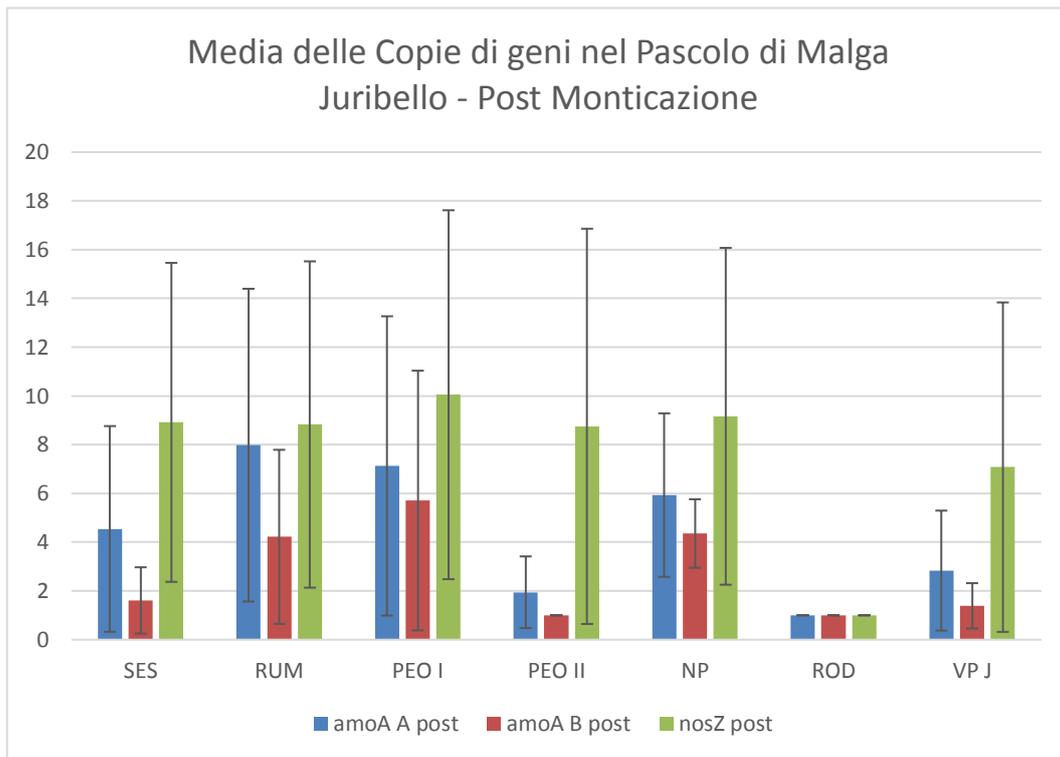


Figura 34 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Juribello in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard - Post monticazione

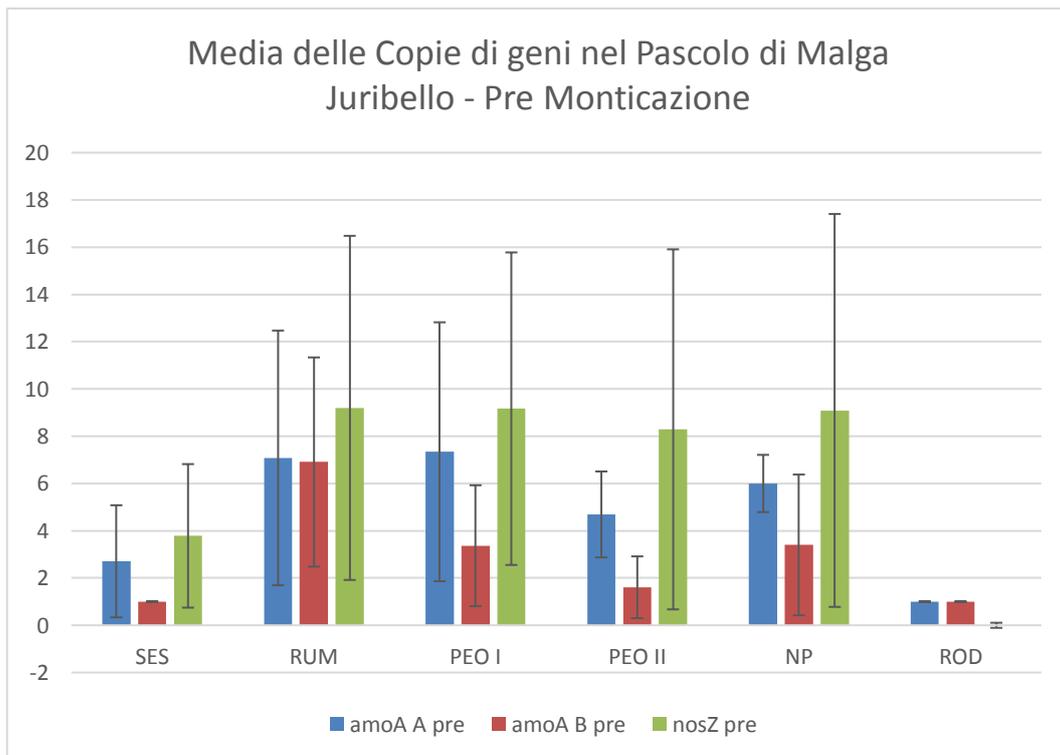


Figura 35 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Juribello in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard - Pre monticazione

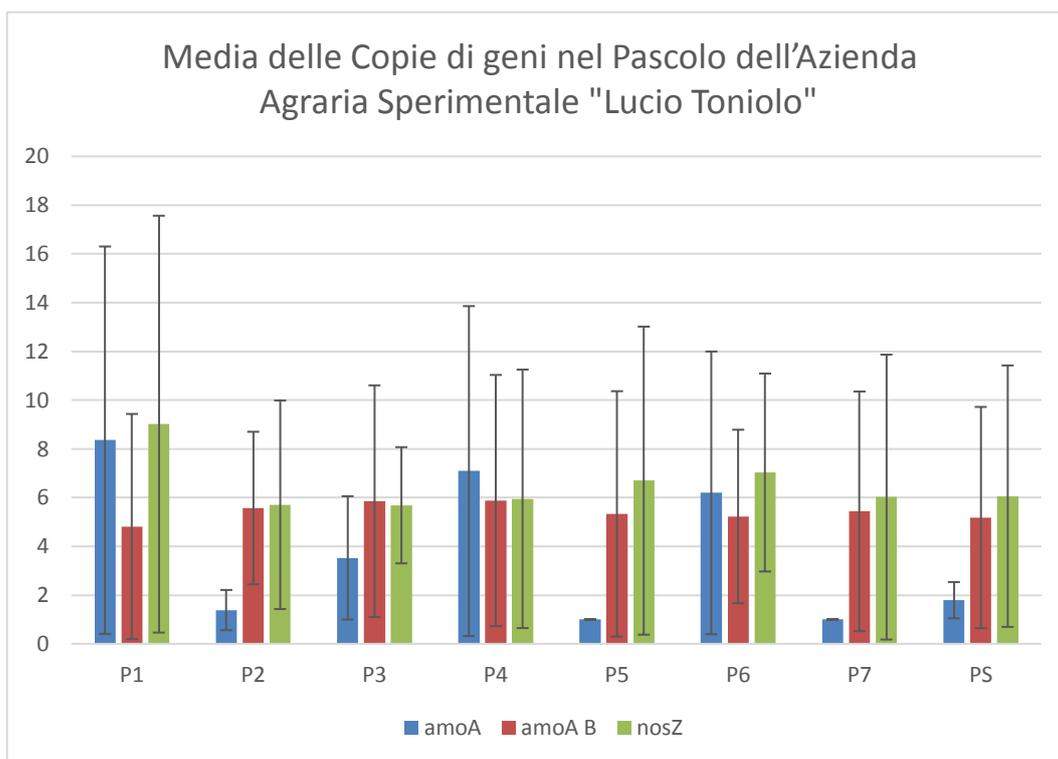


Figura 36 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard

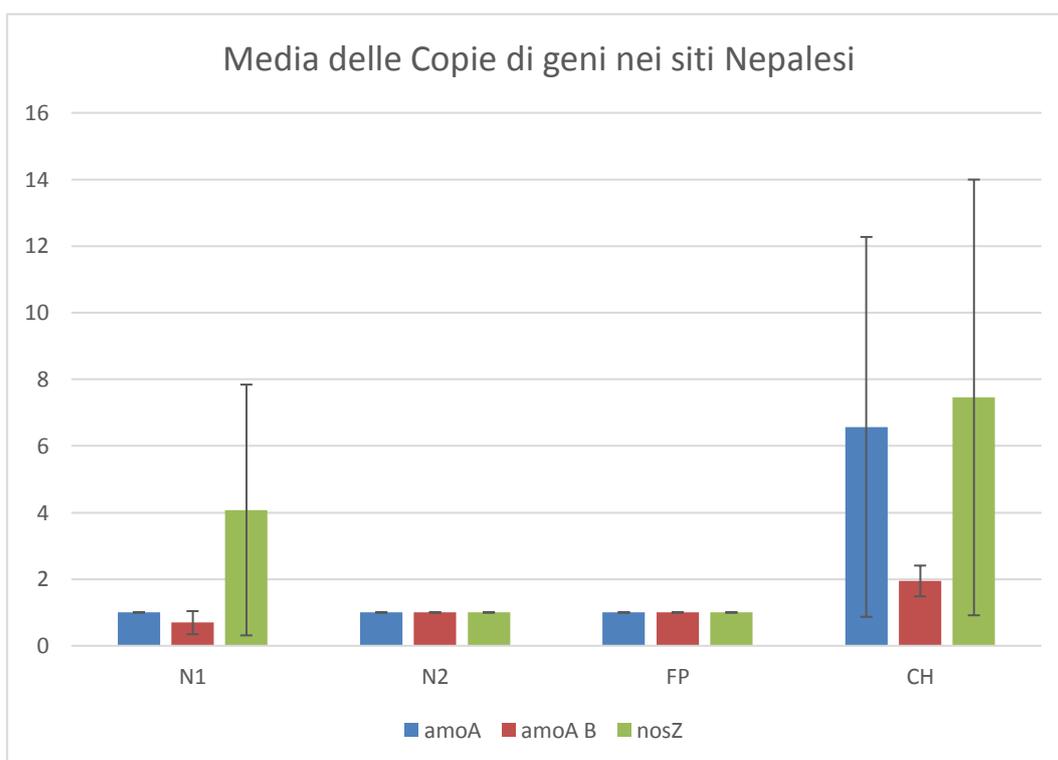


Figura 37 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo dei siti Nepalesi in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard

Gli ortogrammi dei siti nepalesi mostrano una marcata differenza tra i siti del Chitwan, che sono pascolati continuamente da numerose specie locali, da quelli degli altri siti, che sono privi di pascolamento. I siti diversi dal Chitwan mostrano un andamento in termini di abbondanza stimata di geni di copie molto simile.

Gli ortogrammi del pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo" di Agripolis mostrano andamenti differenti: per il gene *amoA Archea* si rilevano dei massimi tra i siti P1, P4 e P6, in maniera analoga al rapporto tra il medesimo *Archea* su *bacteria*. Per gli altri due geni invece la distribuzione è più o meno costante e vede il minimo per quello *amoA bacteria* nel sito di controllo P6.

In generale dagli ortogrammi si può osservare che i siti di controllo di Agripolis (P6 e P7) e Ombretta (PE e B) non mostrano i minimi andamenti a differenza di quelli di Juribello (ROD e SES) dove si possono osservare i valori più bassi. Questo andamento rimane costante per tutti i geni considerati e per il rapporto tra i due *amoA*.

Il risultato del test Kruskal-Wallis ha permesso di evidenziare delle significative differenze all'interno dei pascoli alpini considerati: in quello di Juribello vi è significatività nel periodo pre-monticazione mentre in quello di Ombretta l'esatto opposto. Questo sembra dimostrare che il pascolamento ha un effetto diverso in funzione delle condizioni ambientali: nel pascolo di Ombretta diversifica tra i siti in termini di nitrificazione e denitrificazione, mentre in Juribello omogenizza i due processi. Tuttavia, al fine di verificare questa ipotesi occorrerebbe considerare in maniera più approfondita le variabili ambientali ed effettuare i campionamenti in periodi maggiormente simili. Il test nel caso del pascolo di Agripolis invece non ha permesso di rigettare l'ipotesi di uguaglianza per tutti e tre i siti.

Tabella 4 Analisi attraverso il test di Kruskal-Wallis - Pascolo di Malga Ombretta

<b>Kruskal-Wallis Malga Ombretta <i>nosZ</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0.2654
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.0394
<b>Kruskal-Wallis Malga Ombretta <i>amoA A</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0.4232
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.0099
<b>Kruskal-Wallis Malga Ombretta <i>amoA B</i></b>	
<b>Pre</b>	

<b>p (same):</b>	0.0852
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.0193
<b>Kruskal-Wallis Malga Ombretta <i>amoA A / amoA B</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0,0499
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0,0499

Tabella 5 Analisi attraverso il test di Kruskal-Wallis - Pascolo di Malga Juribello

<b>Kruskal-Wallis Malga Juribello <i>nosZ</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0.0438
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.3124
<b>Kruskal-Wallis Malga Juribello <i>amoA A</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0,0445
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.5689
<b>Kruskal-Wallis Malga Juribello <i>amoA B</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0.0347
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0.2619
<b>Kruskal-Wallis Malga Juribello <i>amoA A / amoA B</i></b>	
<b>Pre</b>	
<b>p (same):</b>	0,0396
<b>Post</b>	
<b>p (same):</b>	0,3057

Tabella 6 Analisi attraverso il test di Kruskal-Wallis - Pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo"

<b>Kruskal-Wallis Agripolis <i>nosZ</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0775
<b>Kruskal-Wallis Agripolis <i>amoA A</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0611
<b>Kruskal-Wallis Agripolis <i>amoA B</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,589
<b>Kruskal-Wallis Agripolis <i>amoA A / amoA B</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,284

Tabella 7 Analisi attraverso il test di Kruskal-Wallis - Siti Nepalesi

<b>Table 1 Kruskal-Wallis Nepal <i>nosZ</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0254
<b>Kruskal-Wallis Nepal <i>amoA Bacteria</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0403
<b>Kruskal-Wallis Nepal <i>amoA Archea</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0133
<b>Kruskal-Wallis Nepal <i>amoA A / amoA B</i></b>	
<b>p (same):</b>	0,0254

L'analisi delle matrici costruite per il test di confronto di Dunn ha permesso di evidenziare le diversità tra gruppi in presenza di significatività. Si è anche applicata la correzione di Bonferroni riducendo la potenza del test attraverso il restringimento di  $\alpha$ , che ha portato generalmente a un non rigetto dell'ipotesi nulla tra siti senza evidenziare le diversità tra siti. Il confronto a coppie nella matrice costruita per ogni campione, coincidente con il singolo sito, ha evidenziato i siti diversi, assumendo un livello di significatività sempre al 5%.

Tabella 8 Matrice di Dunn – Pascolo di Malga Ombretta post nosZ

	<b>B</b>	<b>PE</b>	<b>AB</b>	<b>FV</b>	<b>M</b>	<b>P3</b>	<b>PT</b>	<b>VP</b>
<b>B</b>		0,0689	0,4528	0,6441	0,7728	0,0646	0,0782	0,6441
<b>PE</b>	0,0689		0,0102	0,1748	0,0351	0,9770	0,9539	0,1748
<b>AB</b>	0,4528	0,0102		0,2252	0,6441	0,0094	0,0120	0,2252
<b>FV</b>	0,6441	0,1748	0,2252		0,4528	0,1658	0,1938	1,0000
<b>M</b>	0,7728	0,0351	0,6441	0,4528		0,0326	0,0404	0,4528
<b>P3</b>	0,0646	0,9770	0,0094	0,1658	0,0326		0,9310	0,1658
<b>PT</b>	0,0782	0,9539	0,0120	0,1938	0,0404	0,9310		0,1938
<b>VP</b>	0,6441	0,1748	0,2252	1,0000	0,4528	0,1658	0,1938	

Tabella 9 Matrice di Dunn – Pascolo di Malga Ombretta nosZ con correzione Bonferroni

	<b>B</b>	<b>PE</b>	<b>AB</b>	<b>FV</b>	<b>M</b>	<b>P3</b>	<b>PT</b>	<b>VP</b>
<b>B</b>		1	1	1	1	1	1	1
<b>PE</b>	1		0,2849	1	0,9814	1	1	1
<b>AB</b>	1	0,2849		1	1	0,2621	0,3361	1
<b>FV</b>	1	1	1		1	1	1	1
<b>M</b>	1	0,9814	1	1		0,9135	1	1
<b>P3</b>	1	1	0,2621	1	0,9135		1	1
<b>PT</b>	1	1	0,3361	1	1	1		1
<b>VP</b>	1	1	1	1	1	1	1	

Dalla matrice di Dunn emerge che i siti dove vi è significativa differenza per il gene *nosZ* sono i PE, AB, M, P3 e PT. Nello specifico tra i siti di controllo B e PE, in cui vi è assenza di pascolamento da parte di animali allevati, il primo non presenta significative diversità con quelli pascolati mentre il secondo risulta diverso rispetto ad AB e M. I siti che presentano la maggior diversità rispetto agli altri sono quelli AB e M.

Tabella 10 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello nosZ pre

	<b>SES</b>	<b>RUM</b>	<b>POE I</b>	<b>POE II</b>	<b>NP</b>	<b>ROD</b>
<b>SES</b>		0,0780	0,0918	0,6457	0,0918	0,4435
<b>RUM</b>	0,0780		0,9389	0,1927	0,9389	0,0115
<b>POE I</b>	0,0918	0,9389		0,2202	1,0000	0,0142
<b>POE II</b>	0,6457	0,1927	0,2202		0,2202	0,2202

<b>NP</b>	0,0918	0,9389	1,0000	0,2202		0,0142
<b>ROD</b>	0,4435	0,0115	0,0142	0,2202	0,0142	

Tabella 11 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello *nosZ* pre con correzione di Bonferroni

	<b>SES</b>	<b>RUM</b>	<b>POE I</b>	<b>POE II</b>	<b>NP</b>	<b>ROD</b>
<b>SES</b>		1	1	1	1	1
<b>RUM</b>	1		1	1	1	0,1717
<b>POE I</b>	1	1		1	1	0,213
<b>POE II</b>	1	1	1		1	1
<b>NP</b>	1	1	1	1		0,213
<b>ROD</b>	1	0,1717	0,213	1	0,213	

I siti differenti nel pascolo Juribello dall'analisi della matrice di Dunn per il gene *nosZ* in assenza di vacche corrispondono a POE I, NP e ROD. Il sito di controllo SES, tuttavia, non risulta essere significativamente diverso dagli altri in condizioni di pre-monticazione. Il sito ROD invece, dall'analisi della matrice di Dunn, è quello che presenta la maggior diversità rispetto gli altri all'interno dell'area per quanto riguarda il gene *nosZ*.

Tabella 12 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello *amoA* bacteria pre

	<b>SES</b>	<b>RUM</b>	<b>POE I</b>	<b>POE II</b>	<b>NP</b>	<b>ROD</b>
<b>SES</b>		0,0055	0,0723	0,5134	0,1649	1,0000
<b>RUM</b>	0,0055		0,3269	0,0337	0,1649	0,0055
<b>POE I</b>	0,0723	0,3269		0,2527	0,6829	0,0723
<b>POE II</b>	0,5134	0,0337	0,2527		0,4622	0,5134
<b>NP</b>	0,1649	0,1649	0,6829	0,4622		0,1649
<b>ROD</b>	1,0000	0,0055	0,0723	0,5134	0,1649	

Tabella 13 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello *amoA* bacteria pre con correzione di Bonferroni

	<b>SES</b>	<b>RUM</b>	<b>POE I</b>	<b>POE II</b>	<b>NP</b>	<b>ROD</b>
<b>SES</b>		0,0821	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>RUM</b>	0,0821		1,0000	0,5049	1,0000	0,0821
<b>POE I</b>	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
<b>POE II</b>	1,0000	0,5049	1,0000		1,0000	1,0000
<b>NP</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
<b>ROD</b>	1,0000	0,0821	1,0000	1,0000	1,0000	

I siti con significativa differenza dalla matrice di Dunn per il gene *amoA* bacteria apre-monticazione corrispondono a SES, RUM, POE II e ROD. I siti di controllo SES e ROD nello specifico risultano essere significativamente diversi da quello pascolato RUM. Questo sito dall'analisi della matrice risulta essere quello con maggior diversità rispetto gli altri all'interno dell'area per il gene *amoA* bacteria.

Tabella 14 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta amoA bacteria post

	B	PE	AB	FV	M	P3	PT	VP
B		0,0447	0,7191	0,6530	0,3686	0,0993	0,0993	0,1340
PE	0,0447		0,0179	0,1191	0,0036	0,7191	0,7191	0,6104
AB	0,7191	0,0179		0,4184	0,5896	0,0447	0,0447	0,0632
FV	0,6530	0,1191	0,4184		0,1775	0,2306	0,2306	0,2942
M	0,3686	0,0036	0,5896	0,1775		0,0109	0,0109	0,0165
P3	0,0993	0,7191	0,0447	0,2306	0,0109		1,0000	0,8809
PT	0,0993	0,7191	0,0447	0,2306	0,0109	1,0000		0,8809
VP	0,1340	0,6104	0,0632	0,2942	0,0165	0,8809	0,8809	

Tabella 15 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta amoA bacteria post con correzione di Bonferroni

	B	PE	AB	FV	M	P3	PT	VP
B		1	1	1	1	1	1	1
PE	1		0,5013	1	0,1022	1	1	1
AB	1	0,5013		1	1	1	1	1
FV	1	1	1		1	1	1	1
M	1	0,1022	1	1		0,3039	0,3039	0,4622
P3	1	1	1	1	0,3039		1	1
PT	1	1	1	1	0,3039	1		1
VP	1	1	1	1	0,4622	1	1	

I siti con significativa differenza dall'analisi della matrice di Dunn per il gene *amoA bacteria post* monticazione corrispondono a B, PE, AB, M, P3, PT e VP. I siti di controllo nello specifico presentano una significativa differenza tra loro e per quanto concerne PE anche con AB e M tra quelli pascolati. La matrice di Dunn evidenzia inoltre che il sito M è quello che si diversifica maggiormente tra tutti i restanti nell'area.

Tabella 16 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello amoA Archea pre

	SES	RUM	POE I	POE II	NP	ROD
SES		0,0429	0,0239	0,3704	0,1389	0,7260
RUM	0,0429		0,8152	0,2587	0,5856	0,0175
POE I	0,0239	0,8152		0,1729	0,4360	0,0091
POE II	0,3704	0,2587	0,1729		0,5591	0,2127
NP	0,1389	0,5856	0,4360	0,5591		0,0672
ROD	0,7260	0,0175	0,0091	0,2127	0,0672	

Tabella 17 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello amoA Archea pre con correzione di Bonferroni

	SES	RUM	POE I	POE II	NP	ROD
SES		0,6427	0,3584	1	1	1
RUM	0,6427		1	1	1	0,2627
POE I	0,3584	1		1	1	0,1361
POE II	1	1	1		1	1
NP	1	1	1	1		1
ROD	1	0,2627	0,1361	1	1	

I siti con significativa differenza dall'analisi della matrice di Dunn per il gene *amoA Archea* pre-monticazione in malga Juribello corrispondono a SES, RUM, POE I e ROD. Il sito di controllo SES nel caso del gene *amoA Archea* presenta una significativa diversità con quelli pascolati RUM e POE I. Dalla matrice di Dunn in questo caso non emerge un sito maggiormente diversificato rispetto agli altri.

Tabella 18 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta *amoA Archea* post

	B	PE	AB	FV	M	P3	PT	VP
B		0,2330	0,4851	0,2566	0,2690	0,0549	0,0479	0,6416
PE	0,2330		0,0587	0,9536	0,0216	0,4671	0,4322	0,4671
AB	0,4851	0,0587		0,0669	0,6838	0,0088	0,0074	0,2446
FV	0,2566	0,9536	0,0669		0,0251	0,4322	0,3989	0,5035
M	0,2690	0,0216	0,6838	0,0251		0,0025	0,0020	0,1162
P3	0,0549	0,4671	0,0088	0,4322	0,0025		0,9536	0,1458
PT	0,0479	0,4322	0,0074	0,3989	0,0020	0,9536		0,1304
VP	0,6416	0,4671	0,2446	0,5035	0,1162	0,1458	0,1304	

Tabella 19 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta *amoA Archea* post con correzione di Bonferroni

	B	PE	AB	FV	M	P3	PT	VP
B		1	1	1	1	1	1	1
PE	1		1	1	0,6036	1	1	1
AB	1	1		1	1	0,2476	0,2085	1
FV	1	1	1		0,7027	1	1	1
M	1	0,6036	1	0,7027		0,0695	0,0573	1
P3	1	1	0,2476	1	0,0695		1	1
PT	1	1	0,2085	1	0,0573	1		1
VP	1	1	1	1	1	1	1	

I siti con significativa diversità per il gene *amoA Archea* nel pascolo monticato di Ombretta corrispondono a B, PE, AB, FV, M, P3 e PT. Il sito B di controllo presenta una significativa differenza con quello pascolato PT, mentre quello PE con M. L'analisi della matrice di Dunn evidenzia che i siti M e PT risultano essere quelli con maggior diversità rispetto agli altri all'interno dell'area.

Tabella 20 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta post Rapporto *amoA Archea* su *amoA bacteria*

	B	PE	AB	FV	M	P3	PT	VP
B		0,8850	0,5629	0,0240	0,8170	0,0526	0,4519	0,6855
PE	0,8850		0,6643	0,0163	0,7068	0,0373	0,3698	0,5825
AB	0,5629	0,6643		0,0046	0,4179	0,0118	0,1833	0,3253
FV	0,0240	0,0163	0,0046		0,0429	0,7503	0,1325	0,0641
M	0,8170	0,7068	0,4179	0,0429		0,0878	0,6025	0,8622
P3	0,0526	0,0373	0,0118	0,7503	0,0878		0,2356	0,1252
PT	0,4519	0,3698	0,1833	0,1325	0,6025	0,2356		0,7285

<b>VP</b>	0,6855	0,5825	0,3253	0,0641	0,8622	0,1252	0,7285	
-----------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--

Tabella 21 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta post Rapporto amoA Archea su amoA bacteria con correzione di Bonferroni

	<b>B</b>	<b>PE</b>	<b>AB</b>	<b>FV</b>	<b>M</b>	<b>P3</b>	<b>PT</b>	<b>VP</b>
<b>B</b>		1	1	0,673	1	1	1	1
<b>PE</b>	1		1	0,4575	1	1	1	1
<b>AB</b>	1	1		0,1282	1	0,3315	1	1
<b>FV</b>	0,673	0,4575	0,1282		1	1	1	1
<b>M</b>	1	1	1	1		1	1	1
<b>P3</b>	1	1	0,3315	1	1		1	1
<b>PT</b>	1	1	1	1	1	1		1
<b>VP</b>	1	1	1	1	1	1	1	

I siti con significativa differenza nel pascolo di Ombretta monticato per il rapporto tra i geni *amoA* corrispondono a PE, AB, FV, M e P3. I siti di controllo presentano una significativa differenza con FV, mentre PE anche con P3. Il sito con la maggior diversità all'interno dell'area risulta essere FV dall'analisi della matrice di Dunn.

Tabella 22 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta pre Rapporto amoA Archea su amoA bacteria

	<b>B</b>	<b>PE</b>	<b>AB</b>	<b>FV</b>	<b>M</b>	<b>P3</b>	<b>PT</b>	<b>VP</b>
<b>B</b>		0,0287	0,7192	0,6105	0,3687	0,0632	0,0722	0,1057
<b>PE</b>	0,0287		0,0676	0,0934	0,0020	0,7417	0,6969	0,5692
<b>AB</b>	0,7192	0,0676		0,8809	0,2082	0,1341	0,1504	0,2082
<b>FV</b>	0,6105	0,0934	0,8809		0,1591	0,1776	0,1976	0,2676
<b>M</b>	0,3687	0,0020	0,2082	0,1591		0,0058	0,0070	0,0118
<b>P3</b>	0,0632	0,7417	0,1341	0,1776	0,0058		0,9522	0,8106
<b>PT</b>	0,0722	0,6969	0,1504	0,1976	0,0070	0,9522		0,8573
<b>VP</b>	0,1057	0,5692	0,2082	0,2676	0,0118	0,8106	0,8573	

Tabella 23 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Ombretta pre Rapporto amoA Archea su amoA bacteria con correzione Bonferroni

	<b>B</b>	<b>PE</b>	<b>AB</b>	<b>FV</b>	<b>M</b>	<b>P3</b>	<b>PT</b>	<b>VP</b>
<b>B</b>		0,8043	1	1	1	1	1	1
<b>PE</b>	0,8043		1	1	0,0568	1	1	1
<b>AB</b>	1	1		1	1	1	1	1
<b>FV</b>	1	1	1		1	1	1	1
<b>M</b>	1	0,0568	1	1		0,1636	0,1961	0,3316
<b>P3</b>	1	1	1	1	0,1636		1	1
<b>PT</b>	1	1	1	1	0,1961	1		1
<b>VP</b>	1	1	1	1	0,3316	1	1	

I siti con significativa differenza nel pascolo di Ombretta pre-monticato per il rapporto tra i geni *amoA* corrispondono a B, PE, M, P3, PT e VP. I siti di controllo risultano essere significativamente diversi tra loro, mentre quello PE presenta una

diversità significativa anche con M. Quest'ultimo sito risulta essere quello con maggior diversità tra tutti gli altri all'interno dell'area.

Tabella 24 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello pre Rapporto *amoA* Archea su *amoA* bacteria

	SES	RUM	POE I	POE II	NP	ROD
SES		0,0549	0,8178	0,8779	0,9388	0,0316
RUM	0,0549		0,0316	0,0774	0,0459	0,8178
POE I	0,8178	0,0316		0,7010	0,8779	0,0173
POE II	0,8779	0,0774	0,7010		0,8178	0,0459
NP	0,9388	0,0459	0,8779	0,8178		0,0260
ROD	0,0316	0,8178	0,0173	0,0459	0,0260	

Tabella 25 Matrice di Dunn - Pascolo di Malga Juribello pre Rapporto *amoA* Archea su *amoA* bacteria con correzione di Bonferroni

	SES	RUM	POE I	POE II	NP	ROD
SES		0,8234	1	1	1	0,4732
RUM	0,8234		0,4732	1	0,6881	1
POE I	1	0,4732		1	1	0,2594
POE II	1	1	1		1	0,6881
NP	1	0,6881	1	1		0,3893
ROD	0,4732	1	0,2594	0,6881	0,3893	

I siti con significativa differenza nel pascolo di Juribello pre-monticato per il rapporto tra i geni *amoA* corrispondono a SES, RUM, POE I, POE II, NP e ROD. Il sito di controllo SES è significativamente diverso da ROD, che risulta essere quello maggiormente diverso rispetto tutti gli altri all'interno dell'area.

Le analisi delle singole matrici di Dunn, seguite all'applicazione del test di Kruskal-Wallis, hanno permesso di evidenziare che tra i singoli siti di controllo delle due aree, B e PE per il pascolo di Malga Ombretta e SES per quello di Juribello, e quelli pascolati vi sono tra quest'ultimi alcuni con una maggior diversità per i singoli geni esaminati. Nel caso del pascolo di Ombretta il sito con maggior diversità rispetto a quelli di controllo è M, mentre per Juribello è RUM.

Tabella 26 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *nosZ*

	N1	N2	FP	CH
N1		0,5443	0,5443	0,0433
N2	0,5443		1,0000	0,0086
FP	0,5443	1,0000		0,0086
CH	0,0433	0,0086	0,0086	

Tabella 27 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *nosZ* con correzione di Bonferroni

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		1	1	0,2597
<b>N2</b>	1		1	0,0517
<b>FP</b>	1	1		0,0517
<b>CH</b>	0,2597	0,0517	0,0517	

L'analisi della matrice di Dunn per quanto concerne i siti nepalesi e il gene *nosZ* mostrano una significativa differenza tra quelli del Chitwan e i restanti, in accordo con gli ortogrammi.

Tabella 28 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *amoA* bacteria

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		0,4587	0,4587	0,0799
<b>N2</b>	0,4587		1,0000	0,0127
<b>FP</b>	0,4587	1,0000		0,0127
<b>CH</b>	0,0799	0,0127	0,0127	

Tabella 29 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *amoA* bacteria con correzione di Bonferroni

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		1	1	0,4792
<b>N2</b>	1		1	0,0761
<b>FP</b>	1	1		0,0761
<b>CH</b>	0,4792	0,0761	0,0761	

L'analisi della matrice di Dunn per quanto concerne l'area nepalese e il gene *amoA* bacteria evidenzia una significativa diversità tra i siti CH, FP e N2, mentre non è rigettabile l'ipotesi nulla tra N1 e gli altri.

Tabella 30 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *amoA* Archea

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		1	1	0,0075
<b>N2</b>	1		1	0,0075
<b>FP</b>	1	1		0,0075
<b>CH</b>	0,0075	0,0075	0,0075	

Tabella 31 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi *amoA* Archea con correzione di Bonferroni

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		1	1	0,0448
<b>N2</b>	1		1	0,0448
<b>FP</b>	1	1		0,0448
<b>CH</b>	0,0448	0,0448	0,0448	

La matrice di Dunn per il gene *amoA Archea* tra i siti nepalesi evidenzia una significativa differenza tra CH e gli altri, in accordo con gli ortogrammi. La diversità, inoltre, è evidenziata anche attraverso l'applicazione della correzione di Bonferroni.

Tabella 32 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi Rapporto *amoA Archea* su *amoA bacteria*

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		0,5443	0,5443	0,0047
<b>N2</b>	0,5443		1	0,0262
<b>FP</b>	0,5443	1		0,0262
<b>CH</b>	0,0047	0,0262	0,0262	

Tabella 33 Matrice di Dunn - Siti Nepalesi Rapporto *amoA Archea* su *amoA bacteria* con correzione di Bonferroni

	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>FP</b>	<b>CH</b>
<b>N1</b>		1	1	0,0280
<b>N2</b>	1		1	0,1573
<b>FP</b>	1	1		0,1573
<b>CH</b>	0,0280	0,1573	0,1573	

La matrice di Dunn per il rapporto tra i geni *amoA* nei siti nepalesi ha evidenziato una significativa diversità tra l'area del Chitwan e le altre. Anche con la correzione di Bonferroni è stata evidenziata una significativa differenza tra i siti CH e N1.

Il test di Kruskal-Wallis con l'analisi della matrice di Dunn ha permesso di evidenziare la diversità tra il sito pascolato del Chitwan e gli altri nepalesi, in cui non sussiste un disturbo da pascolamento. Questo risultato è in accordo con gli ortogrammi costruiti dai dati nepalesi.

Il test di Wilcoxon ha permesso di evidenziare differenze tra i pascoli di Malga Ombretta e Juribello per quanto concerne i geni *nosZ* e *amoA Archea*. A livello di singoli siti in entrambi i pascoli non è stata rilevata alcuna diversità, tuttavia a livello di area nel pascolo di Ombretta i due geni mostrano una significativa differenza complessivamente mentre questo non è presente in quello di Juribello. L'unico gene che non presenta significatività tra le due aree è l'*amoA bacteria*, che sia a livello di sito che di area non ha significativa differenza durante i due periodi; questo appare coerente con l'andamento visibile nell'ortogramma specifico. Il test ha evidenziato diversità. Per quanto concerne i rapporti tra i geni *amoA Archea* e batterico vi sono differenze tra le aree: in Malga Ombretta l'ipotesi di uguaglianza tra i due periodi è rigettabile mentre in quella di

Juribello non lo è. il rapporto tra i due geni *amoA* presenta un andamento simile a quello riscontrato per i *nosZ*: tra i siti sia in Juribello che in Ombretta non vi sono differenze significative mentre a livello di area complessiva il test mostra una significativa differenza.

Tabella 34 Risultati dell'applicazione del test di Wilcoxon per il pascolo di Malga Ombretta

<b>Malga Juribello - Confronto Pre e Post Monticazione</b>			
Siti	<i>nosZ</i>	<i>amoA Archea</i>	<i>amoA bacteria</i>
<b>RUM</b>	0,5930	0,5930	0,2851
<b>POE I</b>	0,2851	1	0,2851
<b>POE II</b>	0,2851	0,1797	0,3173
<b>NP</b>	0,5930	1,0000	0,5930
<b>ROD</b>	0,3173		
<b>SES</b>	0,1088	0,3173	0,3173
<b>Area</b>	0,1788	1	0,7897

Tabella 35 Risultati dell'applicazione del test di Wilcoxon per il pascolo di Malga Juribello

<b>Malga Ombretta - Confronto Pre e Post Monticazione</b>			
Siti	<i>nosZ</i>	<i>amoA Archea</i>	<i>amoA bacteria</i>
<b>AB</b>	0,1088	0,1088	0,5930
<b>B</b>	0,1088	0,1088	1
<b>FV</b>	0,2851	0,1797	0,2851
<b>M</b>	0,1088	0,1088	0,2851
<b>P3</b>	0,5930	0,3173	0,1797
<b>PE</b>	0,1088	0,1797	
<b>PT</b>	0,1088	0,3173	0,3173
<b>VP</b>	0,1088	0,1088	0,2851
<b>Area</b>	0,0001	0,0002	0,1986

Tabella 36 Risultati dell'applicazione del test di Wilcoxon per il pascolo di Malga Ombretta - Rapporto tra i geni *amoA*

<b>Malga Ombretta - Confronto Pre e Post Monticazione</b>	
Siti	Rapporto <i>amoA Archea</i> / <i>amoA bacteria</i>
<b>AB</b>	0,2851
<b>B</b>	0,1088
<b>FV</b>	0,1088
<b>M</b>	0,1088
<b>P3</b>	0,1797
<b>PE</b>	0,1797
<b>PT</b>	0,6547
<b>VP</b>	0,1088
<b>Area</b>	0,0005

Tabella 37 Risultati dell'applicazione del test di Wilcoxon per il pascolo di Malga Juribello - Rapporto tra i geni *amoA*

<b>Malga Juribello - Confronto Pre e Post Monticazione</b>	
<b>Siti</b>	<b>Rapporto <i>amoA</i> Archea / <i>amoA</i> Bacteria</b>
<b>RUM</b>	0,1088
<b>POE I</b>	0,5930
<b>POE II</b>	0,6547
<b>NP</b>	0,2851
<b>ROD</b>	
<b>SES</b>	0,3173
<b>Area</b>	0,4328

Tabella 38 Risultati dell'applicazione del test di Wilcoxon per i rapporti tra i geni *amoA* nei pascoli di Malga Ombretta e Juribello

<b>Rapporto <i>amoA</i> Archea / <i>amoA</i> bacteria</b>		
<b>Malga Ombretta</b>	p (stessa mediana):	<b>0,0005</b>
<b>Malga Juribello</b>	p (stessa mediana):	0,4328
<b>Malga Ombretta + Juribello</b>	p (stessa mediana):	<b>0,0261</b>

I clustering sono stati adottati per rappresentare graficamente le diverse distribuzioni tra i siti in termini di abbondanza stimata delle copie di geni. Gli andamenti si differenziano tra i siti e le aree in base ai tre geni nei due periodi considerati. Le distribuzioni generali sono state calcolate considerando i dati in presenza e assenza di vacche al pascolo. Ogni ramo del clustering rappresenta un raggruppamento per somiglianza di abbondanza delle copie dei geni target. L'abbondanza massima è presente tra i rami all'apice e maggiormente spostati verso destra, mentre la minima è rappresentata da quelli più corti e posti alla base e sinistra del grafico. I clustering sono calcolati sulla base di indici di similarità e distanza di Bray-Curtis.

Al pascolo di Malga Ombretta il gene *nosZ* mostra una maggior abbondanza tra le repliche PE 1, PT 2 e 3, FV 3 e P3 3 e 1 mentre quella minore è stata rilevata in B 2, M 3 e FV 2. L'analisi dei cluster del periodo pre-monticazione invece rileva una massima abbondanza del gene tra alcune repliche dei siti B 1, FV 3, P3 1 e AB 2 e 3. L'andamento del cluster per i campioni post monticazione invece, sono più simili a quello generale con le massime abbondanze nelle repliche PE 1, PT 2 e 3, P3 3 e FV 3 mentre le minime tra i B 2, M 3 e FV 1. Il gene *amoA* Archea in generale mostra un andamento in abbondanza di copie massimo tra alcune repliche dei siti FV 3, P3 2 e 3, PE 1 e PT 2 e 3, mentre il

minimo tra alcune dei B 2 e 3. La distribuzione in assenza di vacche al pascolo mostra la massima distribuzione tra le repliche del sito AB 3 mentre nel periodo post monticazione l'andamento corrisponde a quello generale. Il gene *amoA* *bacteria* per quanto riguarda la distribuzione generale mostra quelle massime tra le repliche P3 1, AB 2, M 3, FV 2, B 3 e M 1, 2 e 3; le minime di abbondanza sono state rilevate tra le repliche FV 3, P3 2 e VP 1 e 3. Nel periodo in assenza di vacche al pascolo le distribuzioni si discostano da quelle generali con le massime tra alcune repliche FV 2, M 2 e 3, B 3, AB 2 e P3 1, mentre le minime tra AB 1, B 2, nelle tre di PE e di PT. Le distribuzioni massime durante la monticazione invece si ritrovano tra le repliche dei siti P3 2 e 3, PE 1, FV 3, PT 2 e 3, M 1 e AB 2, mentre le minime coincidono con B 2 e 3, AB 3 e M 2 e 3.

Per quanto concerne il pascolo di malga Juribello la distribuzione delle abbondanze stimate delle copie di geni si differenzia tra i tre tipi. Il gene *nosZ* presenta una distribuzione generale massima tra alcune repliche dei siti ROD 1, 2 e 3, POE II 2 e SES 2 e 3, mentre la minima tra NP 3, POE I 3 e RUM 1 e 3. L'andamento generale non si discosta da quello del periodo pre-monticazione, mentre in presenza di vacche al pascolo le massime distribuzioni si presentano tra i siti NP 1 e 2, SES 3, POE II 1 e RUM 1 e 2, mentre le minime tra RUM 3, VP J 3, ROD 1, 2 e 3, NP 3 e POE I 1, 2 e 3. Il gene *amoA* *Archea* ha una distribuzione generale massima tra le repliche dei siti RUM 1 e 3, POE I 1 e 3 e NP 3, mentre le minime tra quelli SES 2 e 3, POE II 2 e ROD 1. L'andamento in assenza di animali al pascolo segue quello generale a differenza di quello in presenza di vacche che vede le massime distribuzioni tra i siti POE I 3, NP 1 E 2, SES 1, POE II 1, VPJ 2 e RUM 1 e 2. Il gene *amoA* *bacteria* ha una distribuzione massima tra i siti RUM 1, 2 e 3, NP 1, 2 e 3, SES 1 e POE I 1, 2 e 3, mentre quella minima tra i ROD 1, 2 e 3, POE II 2 e 3 e SES 2 e 3. Le distribuzioni pre-monticazioni invece, presenta i valori minimi tra i siti SES 1, 2 e 3, ROD 1, 2 e 3, NP 1 e POE II 2 e 3 e le massime tra quelli POE II 1, POE I 1, 2 e 3, NP 2 e RUM 1, 2 e 3. L'andamento minimo post monticazione segue quello in assenza di vacche, mentre la distribuzione massima si presenta tra i siti POE I 1, 2 e 3, SES 1 e NP 1 e 2.

La distribuzione dei rapporti tra i geni *amoA* mostra andamenti differenti da quelli dei due presenti nelle due aree. La massima distribuzione nel pascolo di Juribello è presente tra i siti POE I 1 e 2, POE II 1 e 3, RUM 1, SES 1 e NP 1, 2 e 3, mentre la minima tra i SES 2 e 3, POE II 2 e ROD 1, 2 e 3. La distribuzione per il rapporto nel pascolo di

Malga Ombretta invece, vede la massima tra i siti AB 1 e 2, M 1, PT 1, PE 3 e VP 3, mentre le minime FV 1, P3 1 e B 1.

L'analisi delle componenti principale (PCA) è stata effettuata per i pascoli di Malga Ombretta e Juribello, considerando i tre geni e le loro stime di copie sia nei periodi monticati che non. L'esito delle due PCA si differenzia nelle distanze tra i geni, mostrando una differenza marcata tra i *nosZ* post monticazione e *amoA* *Archea* nel pascolo di Ombretta, mentre per quello di Juribello la diversità è presente tra i *nosZ* pre-monticazione e post. La PCA di malga Ombretta vede i siti AB 2, 3 e M 1 distaccarsi dagli altri, mentre in quella di Juribello quelli distaccati corrispondono ai RUM 1, 3, POE II 1, POE I 2 e NP 1 e 3.

*Tabella 39 Tabella della varianza per la PCA del Pascolo di Malga Ombretta*

<b>PC</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>% variance</b>
<b>1</b>	8.27162E07	77.841
<b>2</b>	2.34337E07	22.053
<b>3</b>	72758.8	0.068471
<b>4</b>	38620.8	0.036345
<b>5</b>	1494.89	0.0014068
<b>6</b>	2.56657	2.4153E-06

*Tabella 40 Tabella della varianza per la PCA del Pascolo di Malga Juribello*

<b>PC</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>% variance</b>
<b>1</b>	1.50603E08	81.572
<b>2</b>	3.08628E07	16.716
<b>3</b>	2.62885E06	1.4239
<b>4</b>	395257	0.21408
<b>5</b>	124033	0.06718
<b>6</b>	12708.6	0.0068834

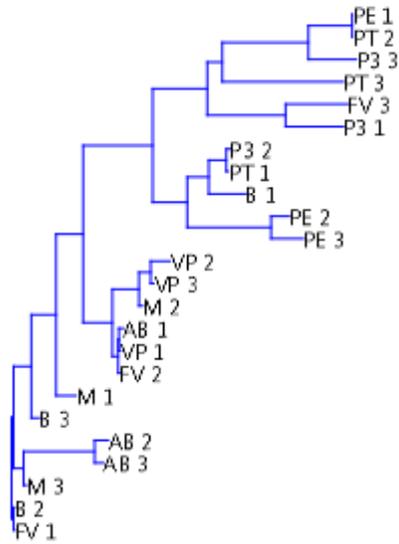


Figura 38 Pascolo di Malga Ombretta, gene *nosZ*

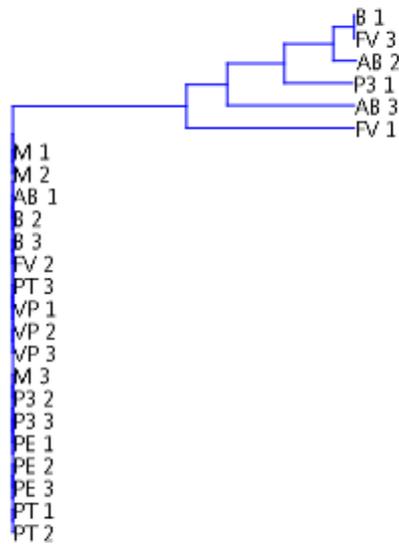


Figura 39 Pascolo di Malga Ombretta, gene *nosZ* pre-monticazione

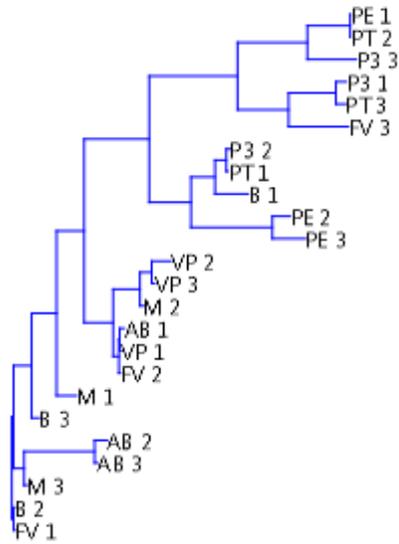


Figura 40 Pascolo di Malga Ombretta, gene *nosZ* post-monticazione

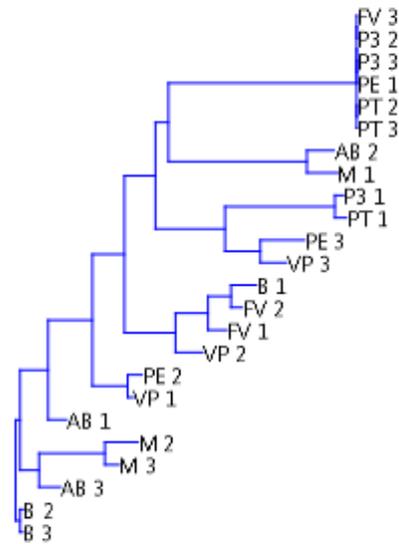


Figura 41 Pascolo di Malga Ombretta, gene *amoA* Archea

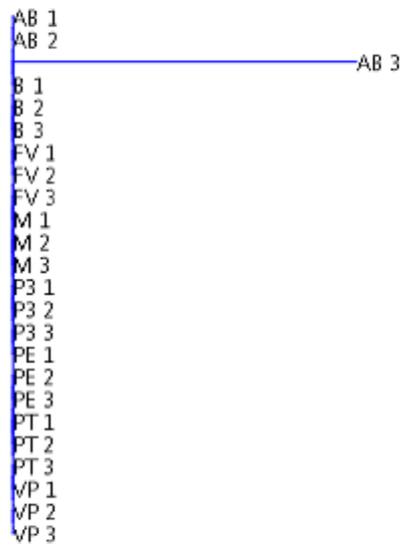


Figura 42 Pascolo di Malga Ombretta, gene amoA Archea pre-monticazione

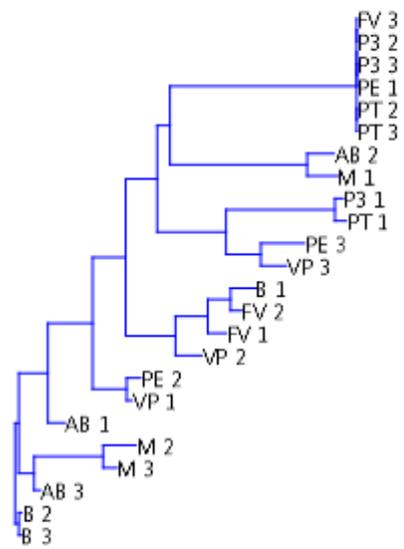


Figura 43 Pascolo di Malga Ombretta, gene amoA Archea post-monticazione

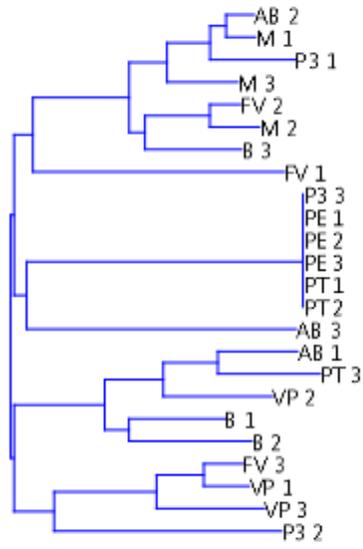


Figura 44 Pascolo di Malga Ombretta, gene amoA bacteria

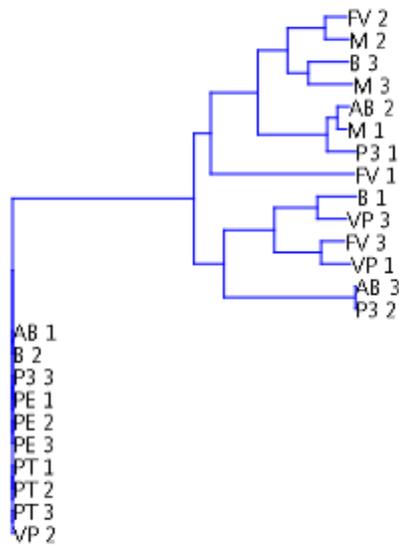


Figura 45 Pascolo di Malga Ombretta, gene amoA bacteria pre-monticazione

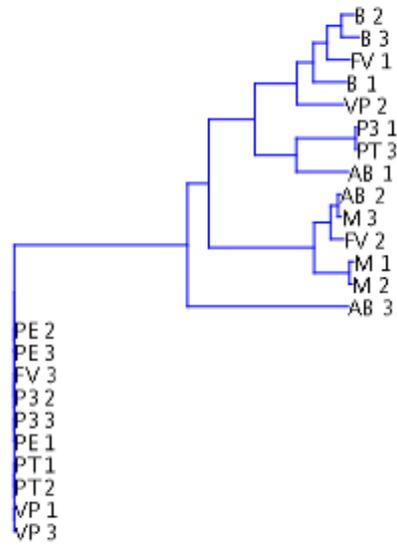


Figura 46 Pascolo di Malga Ombretta, gene amoA bacteria pre-monticazione post-monticazione

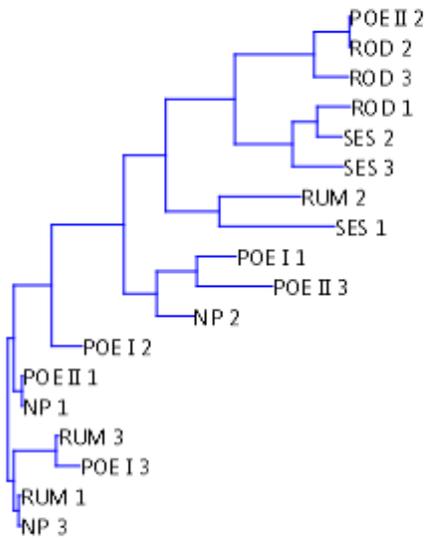


Figura 47 Pascolo di Malga Juribello, gene nosZ

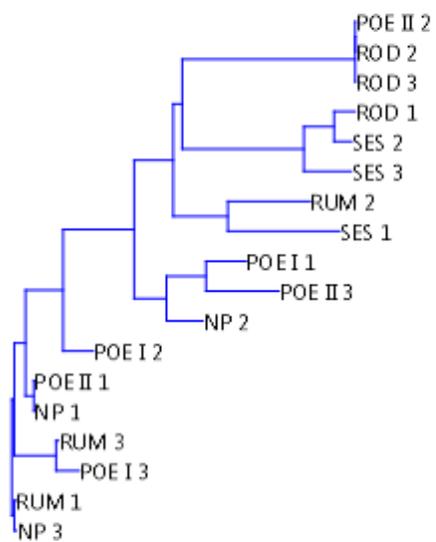


Figura 48 Pascolo di Malga Juribello, gene *nosZ* pre-monticazione

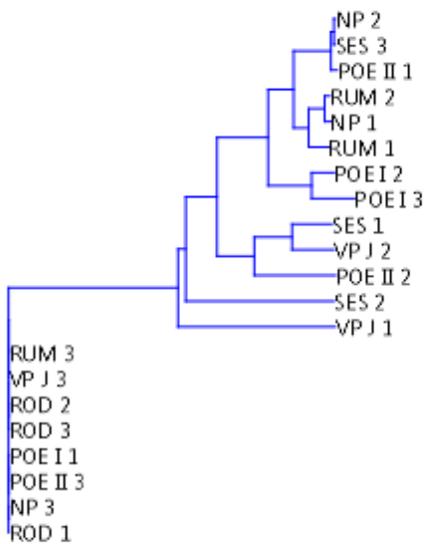


Figura 49 Pascolo di Malga Juribello, gene *nosZ* post-monticazione

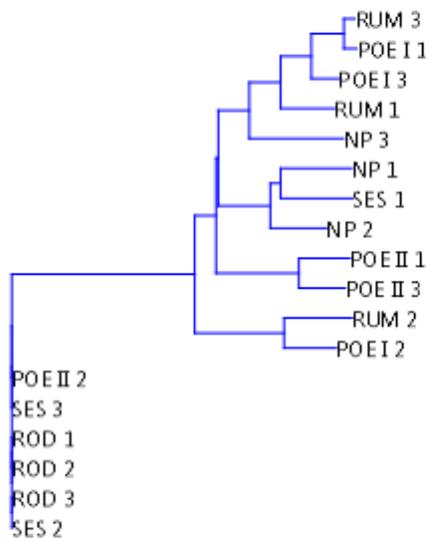


Figura 50 Pascolo di Malga Juribello, gene amoA Archea

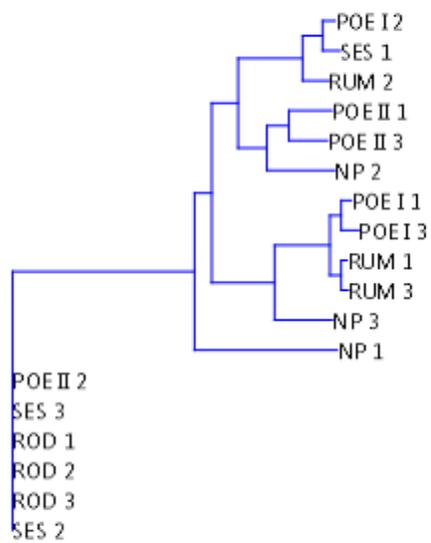


Figura 51 Pascolo di Malga Juribello, gene amoA Archea pre-monticazione

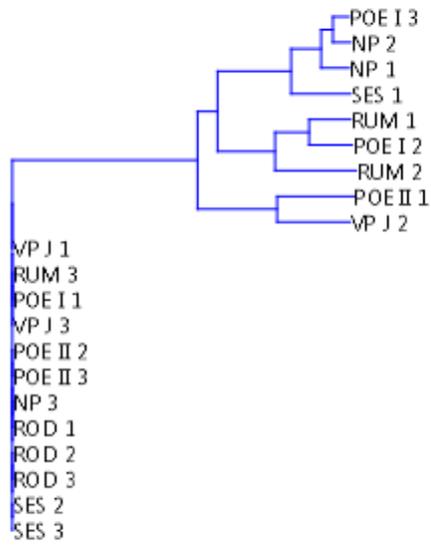


Figura 52 Pascolo di Malga Juribello, gene *amoA* Archea post-monticazione

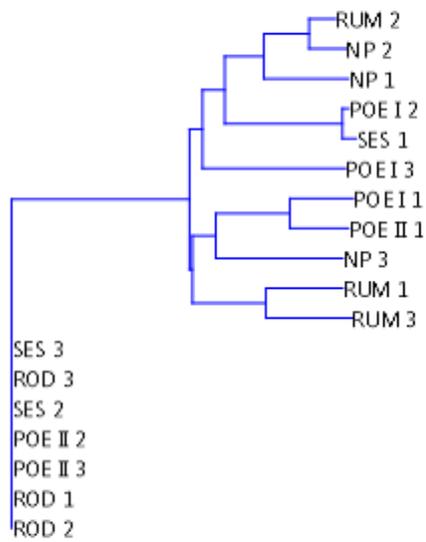


Figura 53 Pascolo di Malga Juribello, gene *amoA* bacteria

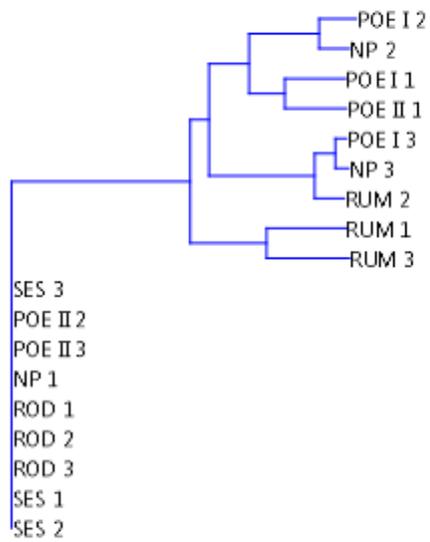


Figura 54 Pascolo di Malga Juribello, gene *amoA* bacteria pre-monticazione

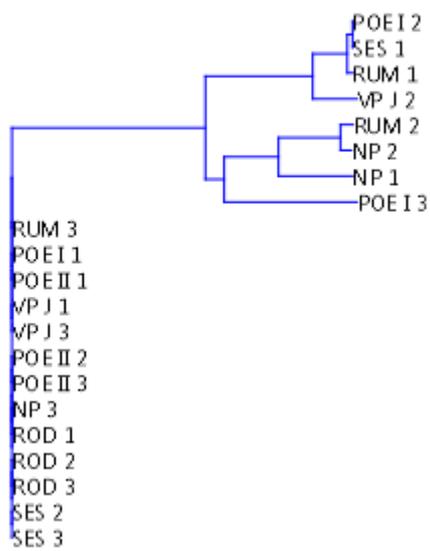


Figura 55 Pascolo di Malga Juribello, gene *amoA* bacteria post-monticazione

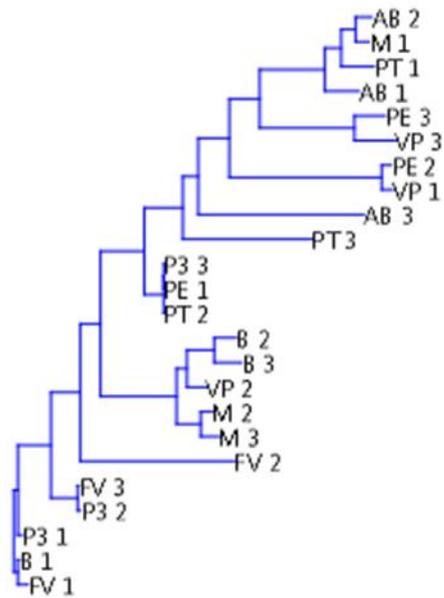


Figura 56 Rapporto amoA Archea su amoA bacteria, Pascolo di Malga Ombretta

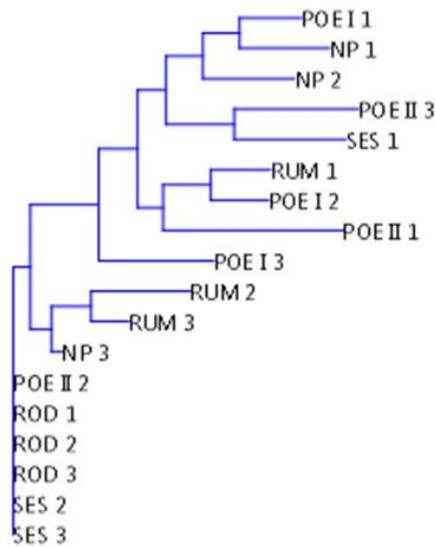


Figura 57 Rapporto amoA Archea su amoA bacteria, Pascolo di Malga Juribello

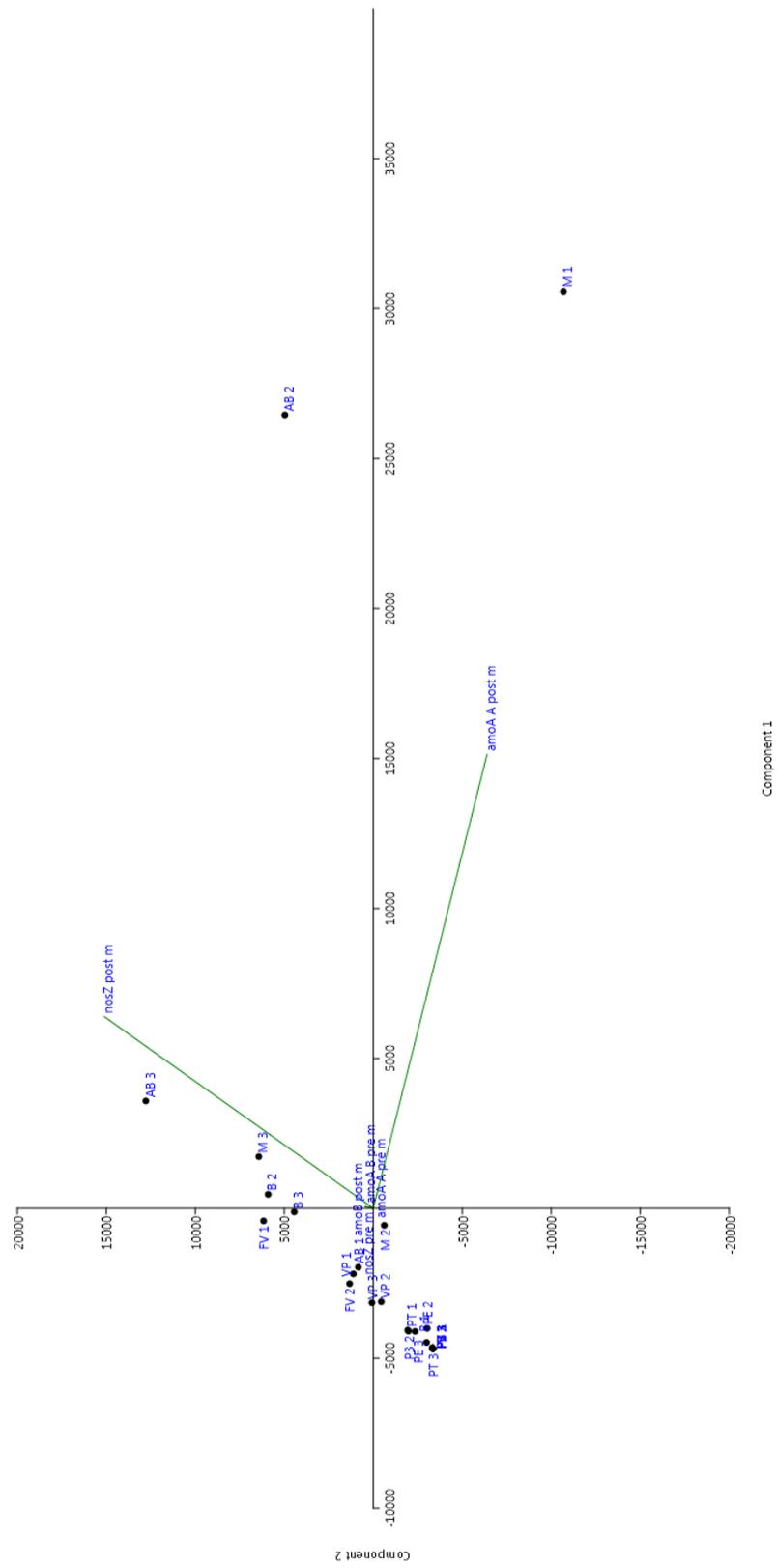


Figura 58 PCA del Pascolo di Malga Ombretta



Nei pascoli di Malga Ombretta e Juribello si è infine calcolata la differenza tra le copie di geni stimate post e pre la monticazione. Questo si è fatto per i singoli tre geni e non per i rapporti tra gli *amoA* in quanto si sono usati solo valori assoluti e non relativi. La presenza di delta positivi dimostra un incremento in termini di copie a seguito della monticazione, sebbene a fronte di questa evidenza non si possa identificare il pascolamento come causa dell'aumento. I delta negativi invece dimostrano un decremento di copie a seguito della monticazione. Le variazioni per singolo sito sono accompagnate dalla deviazione standard campionaria, calcolata a partire dalle tre repliche. Le due aree hanno mostrato andamenti differenti per ogni gene. Il pascolo di malga Ombretta ha mostrato il maggior numero di variazioni positive tra i siti pascolati per i geni *amoA Archea* e *nosZ*. Il pascolo di Juribello tra i siti pascolati, invece, ha mostrato variazioni per lo più negative e a ridotto valore per il gene *amoA Archea* tra i siti pascolati e mediamente positivi per quello *nosZ*. Per quanto concerne il gene *amoA Bacteria* invece gli andamenti tra i siti pascolati in Ombretta sono stati per la maggior parte negativi, mentre per Juribello metà positivi e metà negativi. La maggior parte dei siti di controllo per entrambe le aree ha presentato valori delta non nulli, eccetto PE in Ombretta per il gene *amoA Archea*. Il sito di controllo ROD in Juribello è stato l'unico a presentare variazioni nulle, eccetto per il gene *nosZ*, che tuttavia sono prossime a 0. Questo può indicare che il pascolamento non sia l'unica variabile capace di perturbare il sistema e le sue popolazioni. Infine, i siti in entrambe le aree non hanno mostrato andamenti costanti nelle variazioni, in accordo anche con gli ortogrammi.

Tabella 41 Tabella con il valore numerico della variazione tra le copie di geni nel pascolo di Malga Juribello

Sito	Gene <i>amoA Bacteria</i>		Gene <i>amoA Archea</i>		Gene <i>nosZ</i>	
	Delta	Delta medio per Sito	Delta	Delta medio Sito	Delta	Delta medio Sito
SES	16	5 ± 9	235	78 ± 136	5780	7399 ± 8147
SES	0		0		184	
SES	0		0		16234	
RUM	-746	-934 ± 1171	240	1735 ± 4491	-3503	-3061 ± 13781
RUM	132		6782		10934	
RUM	-2187		-1818		-16616	
PEO I	-7	272 ± 466	-2094	-298 ± 2980	-2074	13598 ± 13607
PEO I	14		3142		20465	
PEO I	810		-1942		22403	
POE II	-15	-5 ± 9	-102	-102 ± 102	6520	2340 ± 3845
POE II	0		0		1548	

<b>POE II</b>	0		-204		-1047	
<b>NP</b>	70	48 ± 126	676	-26 ± 755	1228	670 ± 12710
<b>NP</b>	161		69		13091	
<b>NP</b>	-88		-824		-12310	
<b>ROD</b>	0	0	0	0	-4	-1 ± 2
<b>ROD</b>	0		0		0	
<b>ROD</b>	0		0		0	

Tabella 42 Tabella con il valore numerico della variazione tra le copie di geni nel pascolo di Malga Ombretta

Sito	Gene <i>amoA</i> Bacteria		Gene <i>amoA</i> Archea		Gene <i>nosZ</i>	
	Delta	Delta medio per Sito	Delta	Delta medio Sito	Delta	Delta medio Sito
<b>B</b>	2	-9 ± 26	140	812 ± 582	1058	6858 ± 5085
<b>B</b>	10		1130		10550	
<b>B</b>	-38		1165		8967	
<b>PE</b>	0	0	0	182 ± 274	7	332 ± 291
<b>PE</b>	0		497		569	
<b>PE</b>	0		49		419	
<b>AB</b>	1	349 ± 705	870	9158 ± 14098	4927	13913 ± 7892
<b>AB</b>	-114		25437		19720	
<b>AB</b>	1160		1168		17091	
<b>FV</b>	-1101	-372 ± 632	218	130 ± 115	10422	5170 ± 5249
<b>FV</b>	1		172		5165	
<b>FV</b>	-15		0		-77	
<b>M</b>	-78	-36 ± 52	35325	13377 ± 19010	6968	7539 ± 3729
<b>M</b>	21		2722		4128	
<b>M</b>	-52		2084		11520	
<b>P3</b>	-182	-61 ±	19	6 ± 11	-159	451 ± 919
<b>P3</b>	-1		0		1507	
<b>P3</b>	0		0		4	
<b>PT</b>	0	0 ± 1	17	6 ± 10	1553	533 ± 883
<b>PT</b>	0		0		7	
<b>PT</b>	1		0		39	
<b>VP</b>	-11	-4 ± 8	556	312 ± 241	5096	4050 ± 936
<b>VP</b>	4		308		3291	
<b>VP</b>	-6		73		3763	

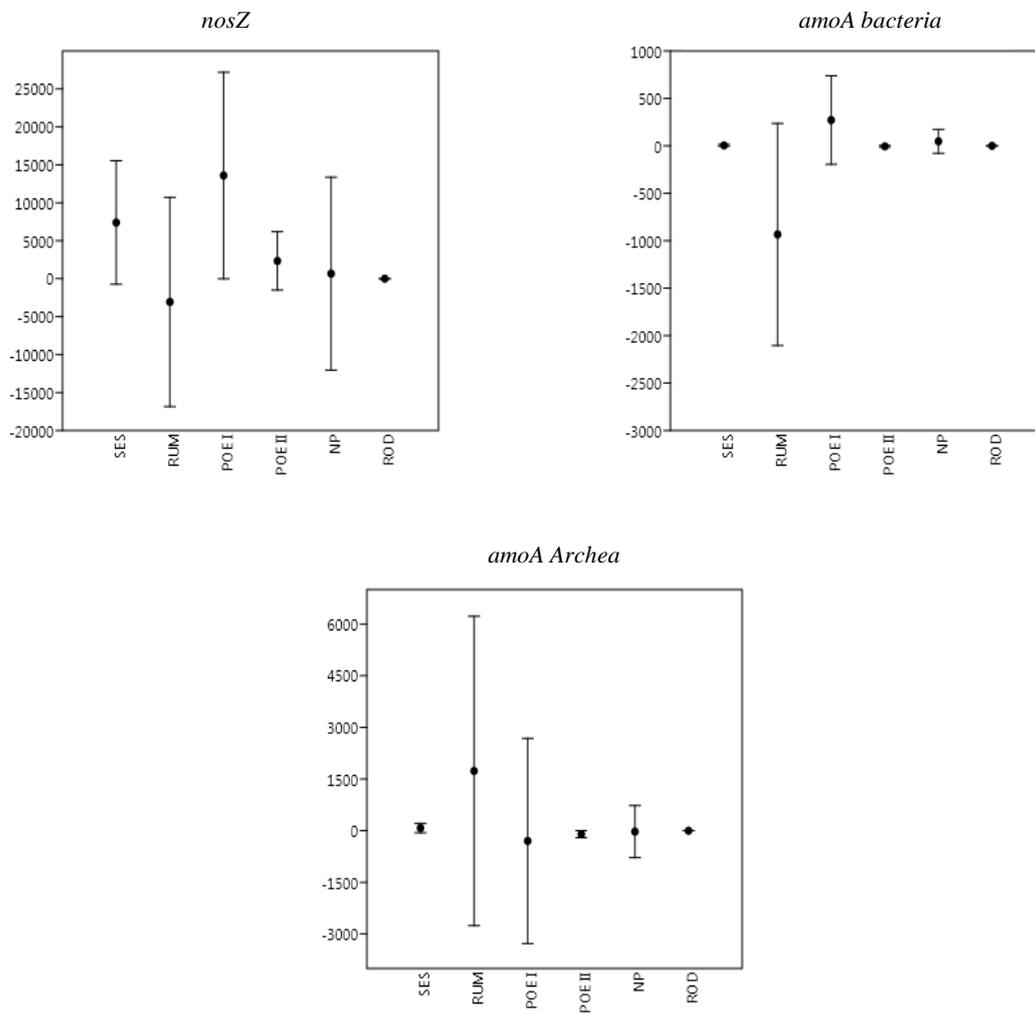


Figura 60 Rappresentazione delle Variazioni di copie di geni post e pre monticazione con deviazione standard - Pascolo di Malga Juribello

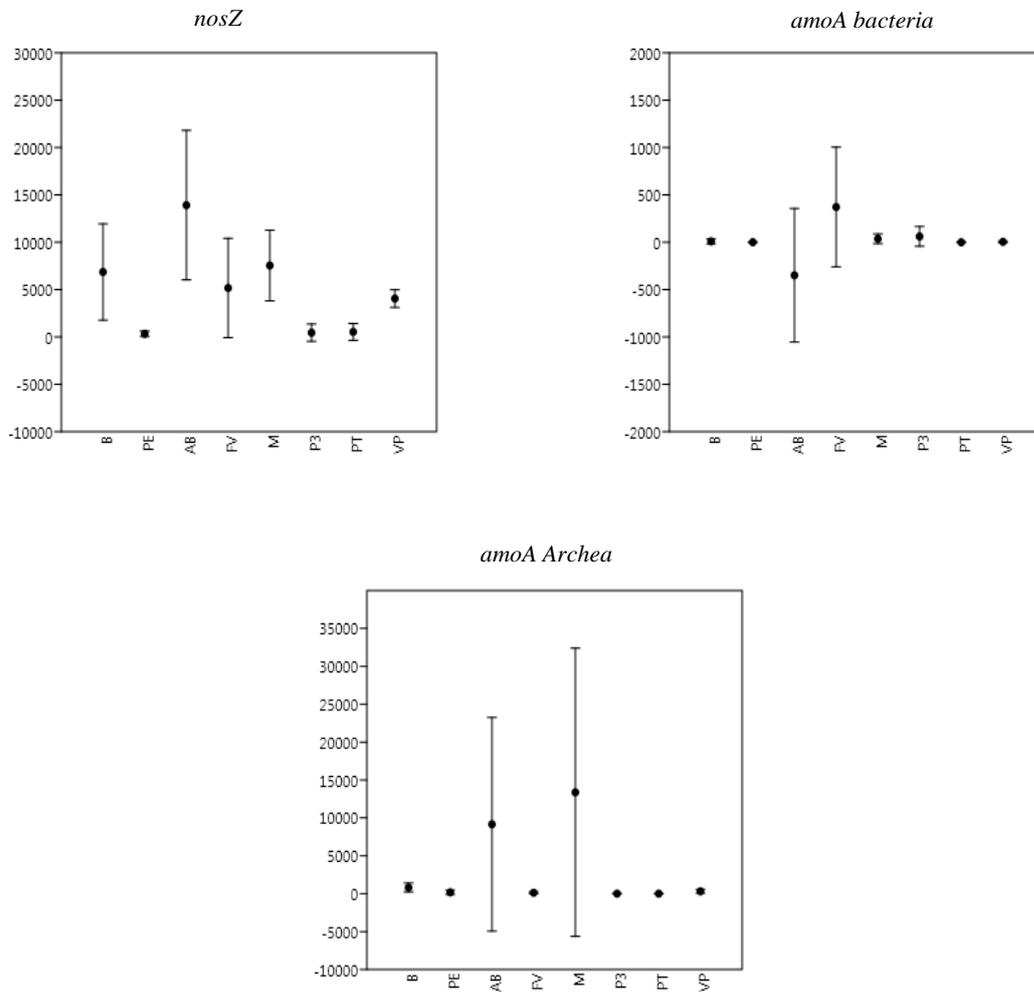


Figure 61 Rappresentazione delle Variazioni di copie di geni post e pre monticazione con deviazione standard - Pascolo di Malga Juribello

## Conclusioni

L'analisi dati ha evidenziato chiare differenze tra i due pascoli studiati per quanto riguarda i geni considerati. Il pascolo di Malga Ombretta ha mostrato un incremento in termini di copie geniche sia per gene *nosZ* che per quello *amoA Archea*, sebbene quest'ultimo presenti variazioni molto diverse tra i singoli siti. Il gene *amoA bacteria*, invece, nell'area ha mostrato andamenti contrastanti tra i siti rispetto gli altri due: vi è stata tendenzialmente una riduzione e una stasi tra i vari siti nei due periodi considerati. Per quanto riguarda il pascolo di Malga Juribello, gli incrementi dei geni *nosZ* e *amoA Archea* sono stati molto più contenuti rispetto a quelli registrati per l'area di Ombretta e anche in questo caso il gene *amoA bacteria* si è dimostrato essere quello con la minor variazione tra i periodi monticati e in assenza di animali. L'analisi statistica ha rilevato che nel pascolo di Malga Ombretta il pascolamento ha incrementato l'eterogeneità tra siti per tutti i tre geni considerati, aumentando l'abbondanza delle comunità. Nel pascolo di Juribello si ha avuto l'effetto opposto: quello di omogeneizzare il sistema. Questi diversi trend possono essere dovuti alle differenze pedoclimatiche e vegetazionali delle due aree, alle diverse frequentazioni e carichi del sito, ma anche alle differenze nei periodi di campionamento. Il pascolo di Malga Ombretta infatti, presenta molti meno capi allevati e una frequentazione turistica ridotta rispetto a quello di Juribello. Anche la morfologia e i suoli tra le due aree differiscono significativamente: La località di Malga Ombretta è una valle con pendenze pronunciate e substrato basico, mentre quella di Malga Juribello è tendenzialmente più pianeggiante con condizioni pedologiche acide. Le pendenze influenzano direttamente le abitudini degli animali allevati, modificando i patterns locali degli impatti dovuti al pascolamento, come il calpestamento, la defogliazione e l'immissione di deiezioni legati al pascolamento. La natura del suolo invece ha conseguenze dirette sulle comunità microbiche, agevolando gli Archea in condizioni di acidità e i Batteri in quelle tendenzialmente più neutre e alcaline. L'omogeneizzazione rilevata al pascolo di Juribello può indicare verosimilmente che mandrie relativamente importanti e capaci di pascolare in gran parte del territorio, grazie a pendenze meno pronunciate, potrebbero ridurre nel tempo la diversità delle comunità microbiche funzionali prative in termini di abbondanze relative. Questo può essere facilitato inoltre dal substrato pedologico acido, che riduce la volatilizzazione di ammoniaca derivata dall'idrolisi dell'urea animale, rendendola ammonio. Questo fenomeno può favorire le

comunità di Archea su quelle batteriche per la diversa affinità al substrato di nitrificazione, spiegando eventuali incrementi nei rapporti tra i due gruppi. Il pascolo di Ombretta, grazie all'incremento di eterogeneità tra i suoi siti a seguito del pascolamento, rivela che verosimilmente un carico bovino ridotto può supportare e favorire una diversità microbica funzionale in termini di abbondanze, soprattutto nei confronti delle comunità denitrificanti e quelle Archea nitrificanti. Il pascolamento in questa area quindi supporta la diversità microbica funzionale. Per verificare in maniera più corretta l'effetto nel pascolo di Juribello, tuttavia, occorrerebbe effettuare i campionamenti in assenza di monticazione in un diverso periodo dell'anno, ossia in autunno come è avvenuto per quello di Ombretta, e non in primavera inoltrata. Questo perché l'attività vegetale e anche quella degli erbivori selvatici risulta essere ridotta nel periodo autunnale rispetto a quello primaverile-estivo. I rapporti tra i geni *amoA* Archea e *bacteria* sono molto più vari nel pascolo di Ombretta, rilevando diverse condizioni trofiche nell'area. Nel pascolo di Juribello i rapporti sono invece, tendenzialmente più costanti, rilevando una condizione trofica più omogenea, in accordo con la maggior somiglianza tra i singoli siti. Inoltre, la presenza di marcate variazioni anche all'interno dei siti di controllo non permette di identificare il pascolamento come unica causa delle perturbazioni del sistema. Non è quindi possibile associare le variazioni delle abbondanze dei geni considerati esclusivamente al pascolamento, che però può essere verosimilmente trattato come una variabile rilevante al fine del fenomeno. Considerare il pascolamento risulta quindi necessario per una corretta contestualizzazione dell'ecosistema prativo e dei suoi processi, specie nei sistemi estensivi simili a quello di Malga Ombretta. Le aree del Nepal e di Legnaro coinvolte nello studio hanno permesso di avere una visione più ampia sul ruolo del pascolamento, nonostante l'assenza di duplici misure nel tempo. L'analisi dei siti nepalesi ha confermato che la presenza del pascolamento può avere effetti positivi sulle abbondanze dei geni studiati nel suolo a differenza della sua assenza; questo trend è in accordo con quello identificato per il pascolo di Malga Ombretta. Il pascolo di Legnaro invece non presenta marcate distinzioni tra i siti pascolati e non, in maniera analoga allo stato monticato riscontrato a Malga Juribello.

I geni utilizzati per la caratterizzazione dei sistemi si sono rivelati essere dei buoni indicatori per lo studio delle comunità microbiche funzionali. Essi hanno permesso di rilevare le variazioni di abbondanza all'interno delle comunità, fornendo informazioni

anche sul potenziale dei processi ecologici di denitrificazione e nitrificazione ad esse legati a livello ecosistemico.

Al fine di migliorare l'approccio di indagine per una più corretta distinzione delle cause e degli effetti nel sistema occorrerebbe caratterizzare meglio le condizioni climatiche e pedologiche locali, definendo per queste lo stato trofico con le concentrazioni dei nutrienti e il pH. Al fine di discriminare adeguatamente gli effetti del pascolamento occorrerebbe sviluppare dei punti di controllo, nelle aree pascolate, il più possibile isolati sia dagli animali ma anche dalla diffusione nel suolo dei substrati utili ai microrganismi studiati. Questo permetterebbe di discriminare i reali effetti del pascolamento rispetto le altre variabili ambientali per valutarne così il reale impatto sulle comunità microbiche del suolo.

In conclusione, è verosimile affermare che il pascolamento possa avere degli impatti sulle comunità microbiche del suolo legate al ciclo dell'azoto, quindi sulla biodiversità funzionale, almeno in termini di abbondanze relative, incrementandole o riducendole. Lo studio dell'impatto ambientale del settore zootecnico con approcci di ecologia molecolare può permettere una visione più approfondita sul funzionamento degli ecosistemi semi-naturali, come i pascoli, e naturali, come le praterie, insieme a tutti i loro processi caratteristici. In un'ottica futura tale approccio potrebbe permettere di qualificare e quantificare in maniera più accurata servizi ecosistemici di regolazione, come lo stoccaggio di carbonio, oltre al potenziale di emissione di specie azotate con forti impatti ambientali, come il protossido di azoto. Una conoscenza più approfondita degli impatti animali sulle comunità microbiche, quindi anche del sistema zootecnico, permetterebbe di intervenire in maniera più consapevole e ragionata sull'attuale cambiamento climatico. Inoltre, permetterebbe anche di delineare in maniera più approfondita e corretta la sostenibilità dei sistemi zootecnici e le sue esternalità. L'approccio molecolare utilizzato in questo studio si potrebbe poi estendere anche alla caratterizzazione dell'impatto animale sulla diversità microbica in termini di specie, sia per le comunità del suolo e sia per quelle endofitiche delle piante. Questo permetterebbe di qualificare il potenziale funzionale microbico degli ecosistemi terrestri più nel dettaglio, valutando le ridondanze funzionali delle comunità microbiche, e investigare lo stato delle probabili relazioni tra microrganismi, piante e animali, in un'ottica anche di miglioramento delle singole produzioni zootecniche.



## Bibliografia

1. Abdalla, M., Hastings, A., Chadwick, D. R., Jones, D. L., Evans, C. D., Jones, M. B., ... & Smith, P. (2018). Critical review of the impacts of grazing intensity on soil organic carbon storage and other soil quality indicators in extensively managed grasslands. *Agriculture, ecosystems & environment*, 253, 62-81.
2. Aldezabal, A., Moragues, L., Odriozola, I., & Mijangos, I. (2015). Impact of grazing abandonment on plant and soil microbial communities in an Atlantic mountain grassland. *Applied Soil Ecology*, 96, 251-260.
3. ARPAV e Regione Veneto (2015), Carta dei Suoli in scala 1:50.000.
4. Baldan, E., Nigris, S., Populin, F., Zottini, M., Squartini, A., & Baldan, B. (2014). Identification of culturable bacterial endophyte community isolated from tissues of *Vitis vinifera* "Glera". *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148(3), 508-516.
5. Bao, Z., Ikunaga, Y., Matsushita, Y., Morimoto, S., Takada-Hoshino, Y., Okada, H., ... & Suzuki, C. (2012). Combined analyses of bacterial, fungal and nematode communities in andosolic agricultural soils in Japan. *Microbes and environments*, 27(1), 72-79.
6. Bargagli, R. (2012). *Ecologia applicata: per un uso consapevole dell'aria, dell'acqua e del suolo*. Amon.
7. Bernués, A. (2017). Animals on the land: ecosystem services and disservices of grazing livestock systems. In *The Meat Crisis* (pp. 89-114). Routledge.
8. Bhattarai, K. R., Måren, I. E., & Chaudhary, R. P. (2011). Medicinal plant knowledge of the Panchase region in the middle hills of the Nepalese Himalayas. *Banko Janakari*, 21(2), 31-39.
9. Bianchi, M., Battaglini, L. M., Berard, S., Brachet Contol, M., Cedrino, M., Ighina, A., ... & Giai Minietti, D. (2009). La gestione sostenibile dei sistemi pascolivi italiani. Progetto interregionale" MASO-GIS. Sviluppo di modelli aziendali sostenibili e multifunzionali per la valorizzazione dei pascoli in aree marginali mediante GIS". Macroarea Alpi e Appennino settentrionale. Aree studio: Valli del Pinerolese.
10. Bittante Giovanni, Ramanzin Maurizio e Andrighetto Igino (2005). "Tecniche di produzione animale." Liviana.

11. Borin M. (1999) *Introduzione all'ecologia del sistema agricolo* Padova, Cleup.
12. Cao, H., Li, M., Hong, Y., & Gu, J. D. (2011). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. *Systematic and applied microbiology*, 34(7), 513-523.
13. Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Hristova, K., & Scow, K. M. (2008). Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 13-18.
14. Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Scow, K. M., & Hristova, K. R. (2007). Effects of arbuscular mycorrhizas on ammonia oxidizing bacteria in an organic farm soil. *Microbial Ecology*, 54(4), 618-626.
15. César Benito Jiménez e Francisco Javier Espino Nuño (2015). *Genetica: concetti essenziali*. Piccin.
16. Chen, J., Zhou, X., Wang, J., Hruska, T., Shi, W., Cao, J., ... & Luo, Y. (2016). Grazing exclusion reduced soil respiration but increased its temperature sensitivity in a Meadow Grassland on the Tibetan Plateau. *Ecology and evolution*, 6(3), 675-687.
17. Dalla Fior, G. (1969). *La nostra flora* (III ediz. a cura del Prof. Luigi Fenaroli). Monau-ni Editore, Trento.
18. Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., ... & Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359(6373), 320-325.
19. Enrico Sturaro, Mara Thiene, Giampaolo Cocca, Meriem Mrad, Tiziano Tempesta & Maurizio Ramanzin (2013) Factors Influencing Summer Farms Management in the Alps, *Italian Journal of Animal Science*, 12:2, DOI
20. Evert R.F. e Eichhorn S.E. (2013). *La biologia delle Piante di Raven*, Bologna, Zanichelli
21. Faccioni Georgia (2017) Ecosystem services and sustainability evaluation of alpine dairy cattle systems. PhD Thesis, Padova
22. Ferrier, S., Ninan, K. N., Leadley, P., Alkemade, R., Acosta, L. A., Akçakaya, H. R., ... & Kabubo-Mariara, J. (2016). The Methodological Assessment Report on Scenarios and Models of Biodiversity and Ecosystem Services. *Secretariat of the*

*Intergovernmental Platform for Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany.*

23. Fowler, J., & Cohen, L. (2010). *Statistica per ornitologi e naturalisti*. Muzzio.
24. Frank, D. A., Wallen, R. L., Hamilton, E. W., White, P. J., & Fridley, J. D. (2018). Manipulating the system: How large herbivores control bottom-up regulation of grasslands. *Journal of Ecology*, *106*(1), 434-443.
25. Gao, D., Liu, F., Li, L., Chen, C., & Liang, H. (2018). Diversity and community structure of ammonia oxidizers in a marsh wetland of the northeast China. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-11.
26. Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., ... & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
27. Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., & Kandeler, E. (2000). Nitrogen dynamics in different types of pasture in the Austrian Alps. *Biology and fertility of soils*, *32*(4), 321-327.
28. He, J. Z., Hu, H. W., & Zhang, L. M. (2012). Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *55*, 146-154.
29. Houlton, B. Z., Morford, S. L., & Dahlgren, R. A. (2018). Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science*, *360*(6384), 58-62.
30. Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., K. Ritz, G. Peres, J. Römbke & Putten, W. H. (2010). European Atlas of Soil Biodiversity.
31. Jerrentrup, J. S., Klimek, S., Marchiori, E., Bittante, G., Ramanzin, M., Sturaro, E., & Marini, L. (2016). Impact of dairy farming on butterfly diversity in Alpine summer pastures. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *232*, 38-45.
32. Jha, P. K., Ghimire, G. P. S., & Tripathi, G. R. (1994). Royal Chitwan National Park past and present. *Tiger Paper*, *21*, 5-10.
33. Jiang, L., Wang, S., Zhe, P., Wang, C., Kardol, P., Zhong, L., ... & Kuzyakov, Y. (2017). Effects of grazing on the acquisition of nitrogen by plants and

- microorganisms in an alpine grassland on the Tibetan plateau. *Plant and Soil*, 416(1-2), 297-308.
34. Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263.
  35. Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist*, 198(3), 656-669.
  36. Legendre, P., & Legendre, L. (1998). Numerical ecology: second English edition. *Developments in environmental modelling*, 20.
  37. Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., ... & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806.
  38. Li, Y., Lin, Q., Wang, S., Li, X., Liu, W., Luo, C., ... & Li, X. (2015). Soil bacterial community responses to warming and grazing in a Tibetan alpine meadow. *FEMS microbiology ecology*, 92(1), fiv152.
  39. Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A. e Clark D.P., (2012) *Brock Biologia dei Microrganismi – 2 Microbiologia ambientale e industriale*, Firenze, Pearson Italia
  40. Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A. e Clark D.P., (2012) *Brock Biologia dei Microrganismi – 1 Microbiologia generale*, Firenze, Pearson Italia
  41. Mendes, L. W., Tsai, S. M., Navarrete, A. A., De Hollander, M., van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2015). Soil-borne microbiome: linking diversity to function. *Microbial ecology*, 70(1), 255-265.
  42. NandaKafle, G., Seale, T., Flint, T., Nepal, M., Venter, S. N., & Brözel, V. S. (2017). Distribution of diverse Escherichia coli between cattle and pasture. *Microbes and environments*, 32(3), 226-233.
  43. Norman, J. S., & Barrett, J. E. (2014). Substrate and nutrient limitation of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in temperate forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 141-146.
  44. Northup, B. K., Brown, J. R., & Holt, J. A. (1999). Grazing impacts on the spatial distribution of soil microbial biomass around tussock grasses in a tropical grassland. *Applied Soil Ecology*, 13(3), 259-270.

45. Orellana, L. H., Rodriguez-R, L. M., Higgins, S., Chee-Sanford, J. C., Sanford, R. A., Ritalahti, K. M., ... & Konstantinidis, K. T. (2014). Detecting nitrous oxide reductase (nosZ) genes in soil metagenomes: method development and implications for the nitrogen cycle. *MBio*, 5(3), e01193-14.
46. Øyvind Hammer (2018). PAST PAleontological Statistics Version 3.20 Reference manual. Natural History Museum University of Oslo
47. Panayiotou, E., Dimou, M., & Monokrousos, N. (2017). The effects of grazing intensity on soil processes in a Mediterranean protected area. *Environmental monitoring and assessment*, 189(9), 441.
48. Paul, E. A. (2014). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
49. Pauleta, S. R., Dell'Acqua, S., & Moura, I. (2013). Nitrous oxide reductase. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(2), 332-349.
50. Prieto, L. H., Bertiller, M. B., Carrera, A. L., & Olivera, N. L. (2011). Soil enzyme and microbial activities in a grazing ecosystem of Patagonian Monte, Argentina. *Geoderma*, 162(3-4), 281-287.
51. Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in microbiology*, 20(11), 523-531.
52. Qu, T. B., Du, W. C., Yuan, X., Yang, Z. M., Liu, D. B., Wang, D. L., & Yu, L. J. (2016). Impacts of grazing intensity and plant community composition on soil bacterial community diversity in a steppe grassland. *PloS one*, 11(7), e0159680.
53. Rook, A. J., Dumont, B., Isselstein, J., Osoro, K., WallisDeVries, M. F., Parente, G., & Mills, J. (2004). Matching type of livestock to desired biodiversity outcomes in pastures—a review. *Biological conservation*, 119(2), 137-150.
54. Scotton, M., Kirmer, A., & Krautzer, B. (2012). Manuale pratico per la raccolta di seme e il restauro ecologico delle praterie ricche di specie.
55. Sims, A., Horton, J., Gajaraj, S., McIntosh, S., Miles, R. J., Mueller, R., ... & Hu, Z. (2012). Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water research*, 46(13), 4121-4129.
56. Smith, T. M., & Smith, R. L. (2007). *Elementi di ecologia*. Milano, Pearson.

57. Song, H., Che, Z., Cao, W., Huang, T., Wang, J., & Dong, Z. (2016). Changing roles of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a continuously acidifying soil caused by over-fertilization with nitrogen. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11964-11974.
58. Spohn M., Spohn R., & Traini, M. (2014). *Riconoscere i fiori spontanei d'Italia e d'Europa*. Ricca.
59. Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., & De Haan, C. (2006). *Livestock long shadow: environmental issues and options*. Rome, Italy: FAO, 390.
60. Szukics, U., Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., & Sessitsch, A. (2012). Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils. *Microbiological research*, 167(2), 103-109.
61. Teague, W. R., Dowhower, S. L., Baker, S. A., Haile, N., DeLaune, P. B., & Conover, D. M. (2011). Grazing management impacts on vegetation, soil biota and soil chemical, physical and hydrological properties in tall grass prairie. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141(3-4), 310-322.
62. Töwe, S., Wallisch, S., Bannert, A., Fischer, D., Hai, B., Haesler, F., ... & Schloter, M. (2011). Improved protocol for the simultaneous extraction and column-based separation of DNA and RNA from different soils. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 406-412.
63. Wessén, E., Söderström, M., Stenberg, M., Bru, D., Hellman, M., Welsh, A., ... & Hallin, S. (2011). Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. *The ISME journal*, 5(7), 1213.
64. Whitlock M. C. and Schluter D. (2010) *Analisi statistica dei dati biologici*, Bologna, Zanichelli.
65. Zanardo, M., Rosselli, R., Meneghesso, A., Sablok, G., Stevanato, P., Altissimo, A., ... & Squartini, A. (2016). Dynamics of soil prokaryotes catalyzing nitrification and denitrification in response to different fertilizers in a greenhouse experiment with *Cynodon dactylon*. *European Journal of Soil Biology*, 76, 83-91.

66. Zhao, F., Ren, C., Shelton, S., Wang, Z., Pang, G., Chen, J., & Wang, J. (2017). Grazing intensity influence soil microbial communities and their implications for soil respiration. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 249, 50-56.
67. Zhong, L., Bowatte, S., Newton, P. C., Hoogendoorn, C. J., Li, F. Y., Wang, Y., & Luo, D. (2015). Soil N cycling processes in a pasture after the cessation of grazing and CO<sub>2</sub> enrichment. *Geoderma*, 259, 62-70.
68. Zhong, L., Hoogendoorn, C. J., Bowatte, S., Li, F. Y., Wang, Y., & Luo, D. (2016). Slope class and grazing intensity effects on microorganisms and nitrogen transformation processes responsible for nitrous oxide emissions from hill pastures. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 217, 70-78.
69. Zhu, Y. G., Gillings, M., Simonet, P., Stekel, D., Banwart, S., & Penuelas, J. (2017). Microbial mass movements. *Science*, 357(6356), 1099-1100.
70. Ziliotto U., Scotton M. e Gianelle D. (1996) Effetti della concimazione e dell'utilizzazione sul comportamento di un prato polifita seccagno della pianura padano-veneta – 1 Composizione floristica e aspetti quantitativi della produzione. *Rivista di Agronomia*, 30, 4, 646-664



## Ringraziamenti

Scrivere i ringraziamenti è sempre una delle parti più difficile e richiede un impegno di memoria non indifferente. Data la scarsa capacità memonica del mio neurone scrivere le poche righe che seguiranno sarà una vera sfida. Spero di non dimenticarmi di nessuno, dato che questa parte sarà una delle poche lette con cura da chi avrà in mano questo lavoro.

Tra le prime persone a cui devo un sincero grazie ci sono i Professori Andrea Squartini ed Enrico Sturaro, che hanno creduto in questo lavoro fin da subito, quando ancora era una vaga e confusa idea nella mia testa. Il loro supporto è stato indispensabile non solo a livello logistico ma soprattutto nello sviluppo e nella selezione delle singole sfaccettature di questo lavoro. Andare a campionare tra i pascoli alpini in loro compagnia è stata un'esperienza arricchente sotto molti punti vista: quello didattico, quello culinare e soprattutto personale. Anche i momenti passati in ufficio a ragionare sul da farsi sono stati momenti preziosi e indispensabili per la riuscita finale. Grazie alla loro guida l'intero lavoro di tesi è stata una piacevole scoperta, che mi ha lasciato molte domande e curiosità da approfondire in futuro, spero.

Un grazie speciale va anche al team di laboratorio, Giovanni, Matteo, Claudia e Maria Cristina. Senza di loro non sarei mai riuscito a svolgere le analisi ma soprattutto sarebbero state ore più cupe quelle in laboratorio senza la loro compagnia e accoglienza, specie per le performance canore di Matteo, i racconti dei viaggi di Claudia e la saggia pazienza di Giovanni. A Giovanni in particolar modo devo un profondo riconoscimento perché con una rara pazienza mi ha sempre aiutato in tutte le analisi nonostante il mio essere pasticciatore; senza di lui non avrei ricavato tutti i dati, ma soprattutto non avrei appreso molte competenze e conoscenze tecniche indispensabili. Maria Cristina invece la devo ringraziare partendo dall'esperienza nepalese condivisa, dove mi ha aiutato nei campionamenti, anche in situazioni di dubbia sicurezza con un rinoceronte adulto al pascolo a pochi metri di distanza (che alla fine optò di andare a immergersi nel fiume mentre raccoglievamo del suolo e la guida continuava a ripetere "hurry up"). La sua compagnia in laboratorio poi ha contribuito ad alleggerire i carichi di lavoro.

Un grazie voglio dedicarlo anche al Professor Giuseppe Concheri che si è sempre dimostrato disponibile con il sorriso durante le ore di laboratorio e per i confronti sulla

tesi, fornendomi un fondamentale supporto con preziose informazioni riguardo i vari suoli.

Dovrei in realtà ringraziare anche tutti i professori avuti in questi anni di università, specie quelli del percorso magistrale, che attraverso la condivisione delle loro nozioni e idee, hanno alimentato la mia curiosità e dissetato la mia sete di conoscenza. Ogni singolo corso ha contribuito allo sviluppo di questo lavoro in realtà, aggiungendo un punto di vista indispensabile per tentare di cogliere l'insieme nel giusto contesto. Mi ritengo fortunato ad aver incontrato persone, prima che docenti, disponibili al confronto e all'ascolto.

Passo ai parenti ora, non per questo meno importanti dei professori. Un grazie innanzitutto a mia madre e mio padre che mi hanno sempre supportato in ogni fase di questo lavoro con le loro possibilità. Devo ammettere che è stato soddisfacente riuscire a discutere consapevolmente con mia madre riguardo l'analisi statistica dei dati, questo mi ha permesso di mettere una spunta sulla lista delle cose da fare (capire cosa diavolo farsene di una matrice di dati in maniera il più possibile autonoma). Un grazie anche alla mia sorellona, che mi ha aiutato durante questi anni negli esami in lingua con “tanta tanta” pazienza. Un grazie anche ai miei nonni che pur capendo una minima parte (come tutti del resto eccetto i miei professori), hanno sempre ascoltato il fluire delle mie idee e racconti riguardo questo lavoro. Un grazie speciale poi va al mio cugino Leonardo (per me Nano, in senso affettivo ovviamente) che mi ha accompagnato ignaro (anzi ingannato da me medesimo) nell'ultimo campionamento in Val Ombretta, camminando oltre 17 km su e giù per i monti al mio passo e rischiando scivolamenti su prati non proprio pianeggianti, ma stupendi dal punto di vista floristico (mentre lui e Federico Sartori rischiavano scivolate tra le graminacee, io ero catturato dai tanti fiori, incurante della precaria stabilità della situazione per lo scarso attrito statico e le pendenze). Spero che questo campionamento sia solo l'inizio di una lunga serie di passeggiate (a ritmi più ortodossi) tra i monti, i pascoli e le vacche.

Concludo con gli amici. Tra tutti un grazie al buon Federico Sartori, che insieme a mio cugino, mi ha accompagnato nell'ultima scampagnata alzandosi a orari “salvatoreschi” (abbiamo potuto vedere così l'alba lungo la strada). Un grazie va poi ai miei tre amici “Davidi”: il Pera, il DiDi e il Dadone. Questi tre personaggi mi hanno sempre sostenuto durante questi anni di università, soprattutto in questi ultimi due,

ascoltandomi e condividendo il loro tempo. Sono stati tre amici cari su cui ho sempre potuto contare nonostante le distanze. Stesso discorso per Riki, che ha saputo rallegrare questo periodo di lavoro intellettuale. Un grazie importante va anche ad Andrè, che tra una trasferta e l'altra, è sempre rimasto in mio ascolto, spronandomi a dare il meglio e a non mollare mai. Un grazie anche al Pesce, che durante le numerose partite in coppia a biliardo al tavolo 19 o 30 e i cinema domenicali, ha contribuito a rallegrare il periodo di lavoro con la sua eccezionale simpatia. Un grazie anche a tutta la compagnia del Re, quindi Alby, Fede, Woody (nonostante ora sia a Barcellona) e Leo con cui ho condiviso bellissimi momenti d'amicizia. Un grazie anche ad Andrea Dori che più di altri amici mi ha aiutato nello sviluppo di idee grazie al suo bagaglio da biologo molecolare e motivato nell'arrampicata (un'indispensabile valvola di sfogo), nonostante gli scarsi risultati. Al di là di questo Andrea lo voglio ringraziare profondamente per avermi coinvolto nella gestione del Rifugio Pietro Galassi sull'Antelao, donandomi un'opportunità unica. In quella settimana passata con la mitica "Gestione Spettacolo" (un gruppo di veneti doc) ho potuto sviluppare molte idee riguardo l'analisi dati di questo lavoro e molte considerazioni finali. L'aria e il clima del rifugio sono state fondamentali nella riuscita finale, grazie anche alle tisane al finocchio di Bianca e l'aiuto di Giulia nei lavori mattutini (senza entrambe non sarei riuscito a lavorare allo stesso modo). Un grazie anche alla mia Sister, Elisabetta, che nonostante sia a Milano, riesce sempre ad essere presente per condividere sia i bei momenti che i disagi. Voglio ringraziare anche Elena che con la sua curiosità e il suo entusiasmo intellettuale riesce a essere una spinta ad approfondire molteplici realtà. Tra le altre persone a cui devo un sincero grazie c'è Michele, che in questi anni di università è stata una vera colonna di sostegno su cui poter sempre contare e trarre spunto per il suo impegno e la sua calma. Un grazie infine al mio compagno di corsa Marco che, tra discorsi di scienza (in chiave azzarderei filosofica) e morti-resurrezioni per il tentativo di superare i nostri limiti, ha contribuito in maniera indiretta a tutto questo lavoro.

Alla fine, questo lavoro lo definirei di gruppo perché senza il contributo di ogni singola persona citata e non (molte sono quelle che dovrei continuare a ringraziare e che hanno aggiunto qualche dettaglio al tutto) sarei difficilmente qui dove sono ora, ossia davanti al monitor della mia scrivania con un afoso caldo di fine estate a scrivere le battute finali di un lavoro durato un anno. In questi due anni sono passato dallo studio delle falene

a quello dei microrganismi per valutare gli impatti antropici e studiare la biodiversità, cercando di mantenere sempre un approccio ecologico-olistico e una visione delle sfide quasi ludica. Proprio per questo motivo ogni piccolo contributo e visione differente, derivate dalle persone con cui ho condiviso il mio tempo, è stato indispensabile. È stato un vero piacere sviluppare questa idea, partendo dai piccoli pensieri quotidiani. Grazie a tutti per ogni piccolo spunto.

# Allegati

Tabella 43 Matrice dati Malga Ombretta

Sito	Replica	Area	Ct annoA a - p.m.	Gene copies	Ct annoA b - p.m.	Gene copies	Ct nosZ - p.m.	Gene copies	Ct annoA a - m.	Gene copies	Ct annoA b - m.	Gene copies	Ct nosZ - m.	Gene copies
AB	1	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	31	870	38	2	28	4927
AB	2	Malga Ombretta	45	0	30	145	34	75	26	25437	33	30	26	19795
AB	3	Malga Ombretta	33	170	38	1	30	956	30	1338	27	1161	26	18047
B	1	Malga Ombretta	45	0	36	4	34	97	34	140	36	6	30	1155
B	2	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	31	1130	35	10	27	10550
B	3	Malga Ombretta	45	0	32	50	45	0	30	1165	34	12	27	8967
FV	1	Malga Ombretta	45	0	27	1109	40	2	33	218	35	8	27	10424
FV	2	Malga Ombretta	45	0	33	34	45	0	33	172	33	35	28	5165
FV	3	Malga Ombretta	45	0	34	15	34	97	45	0	45	0	36	20
M	1	Malga Ombretta	45	0	30	128	45	0	26	35325	32	50	27	6968
M	2	Malga Ombretta	45	0	33	26	45	0	29	2722	32	48	28	4128
M	3	Malga Ombretta	45	0	31	83	45	0	30	2084	33	31	26	11520
P3	1	Malga Ombretta	45	0	30	183	33	203	37	19	39	1	35	44
P3	2	Malga Ombretta	45	0	39	1	45	0	45	0	45	0	30	1507
P3	3	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	39	4
PE	1	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	38	7
PE	2	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	32	497	45	0	31	569
PE	3	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	35	49	45	0	32	420
PT	1	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	37	17	45	0	30	1553
PT	2	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	38	7
PT	3	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	45	0	38	1	35	39
VP	1	Malga Ombretta	45	0	35	11	45	0	32	556	45	0	28	5096
VP	2	Malga Ombretta	45	0	45	0	45	0	32	309	36	4	28	3292
VP	3	Malga Ombretta	45	0	35	6	45	0	35	73	45	0	28	3763

Tabella 44 Matrice dati Malga Juribello

Sito	Replic a	Area	Ct annoA a - p.m.	Gene copies	Ct annoA b - p.m	Gene copies	Ct nosZ - p.m	Gene copies	Ct annoA a - m.	Gene copies	Ct annoA b. - m.	Gene copies	Ct nosZ - m.	Gene copies
RUM	1	Malga Juribello	30	1679	28	763	26	12609	30	1919	34	17	27	9107
RUM	2	Malga Juribello	35	72	32	56	32	426	28	6853	30	188	26	11360
RUM	3	Malga Juribello	30	1818	26	2187	26	16616	45	0	45	0	45	0
PEOI	1	Malga Juribello	30	2095	35	7	29	2074	45	0	45	0	45	0
PEOI	2	Malga Juribello	35	54	37	2	27	7327	29	3197	34	16	25	27792
PEOI	3	Malga Juribello	29	2484	31	76	26	19273	32	542	27	886	24	41676
POE II	1	Malga Juribello	34	122	34	15	27	10910	37	19	45	0	26	17430
POE II	2	Malga Juribello	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	30	1548
POE II	3	Malga Juribello	33	204	45	0	30	1047	45	0	45	0	45	0
NP	1	Malga Juribello	38	12	45	0	27	10938	31	688	31	70	26	12165
NP	2	Malga Juribello	32	375	37	3	28	3392	32	444	30	164	26	16484
NP	3	Malga Juribello	31	824	31	88	26	12310	45	0	45	0	45	0
ROD	1	Malga Juribello	45	0	45	0	39	4	45	0	45	0	45	0
ROD	2	Malga Juribello	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0
ROD	3	Malga Juribello	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0	45	0
SES	1	Malga Juribello	35	45	45	0	34	118	33	280	34	16	27	5899
SES	2	Malga Juribello	45	0	45	0	39	5	45	0	45	0	33	188
SES	3	Malga Juribello	45	0	45	0	38	8	45	0	45	0	26	16243
VPJ	1	Malga Juribello							45	0	45	0	38	7
VPJ	2	Malga Juribello							35	49	35	10	28	3550
VPJ	3	Malga Juribello							45	0	45	0	45	0

Tabella 45 Matrice dati Siti Nepalesi e Pascolo dell'Azienda Agraria Sperimentale "Lucio Toniolo

Sito	Area	Ct amoA a	Gene copies	Ct amoA b	Gene copies	Ct nosZ	Gene copies
P1	Agripolis	28	5835	31	112	27	6145
P1	Agripolis	29	3850	30	147	27	6799
P1	Agripolis	29	3076	31	109	26	11715
P2	Agripolis	38	11	31	123	31	560
P2	Agripolis	45	0	31	126	33	219
P2	Agripolis	45	0	28	540	34	124
P3	Agripolis	34	87	31	94	31	620
P3	Agripolis	37	15	28	552	33	162
P3	Agripolis	45	0	29	401	34	101
P4	Agripolis	29	3587	30	148	31	585
P4	Agripolis	45	0	28	499	32	342
P4	Agripolis	38	8	29	429	33	226
P5	Agripolis	45	0	29	266	31	545
P5	Agripolis	45	0	30	192	30	1052
P5	Agripolis	45	0	30	163	31	831
P6	Agripolis	36	32	31	117	29	2461
P6	Agripolis	45	0	29	433	33	180
P6	Agripolis	30	1437	35	7	31	747
P7	Agripolis	45	0	29	315	32	407
P7	Agripolis	45	0	29	244	32	348
P7	Agripolis	45	0	30	130	31	481
PS	Agripolis	39	7	30	187	32	309
PS	Agripolis	38	12	31	89	31	676
PS	Agripolis	45	0	29	258	32	300
N1	Panchase	45	0	45	0	33	177
N1	Panchase	45	0	35	6	45	0
N1	Panchase	45	0	45	0	45	0
N2	Panchase	45	0	45	0	45	0
N2	Panchase	45	0	45	0	45	0
N2	Panchase	45	0	45	0	45	0
FP	Panchase	45	0	45	0	45	0
FP	Panchase	45	0	40	0	45	0
FP	Panchase	45	0	45	0	45	0
CH	Chitwan	31	960	34	13	29	2111
CH	Chitwan	31	949	39	1	29	2519
CH	Chitwan	33	235	35	7	31	556

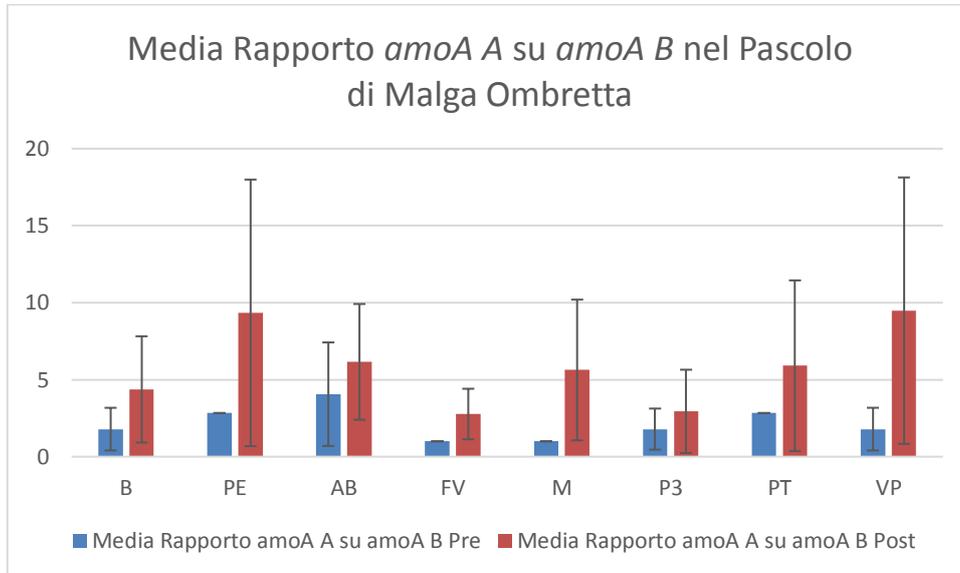


Figure 62 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Ombretta in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard per il rapporto tra i geni *amoA*

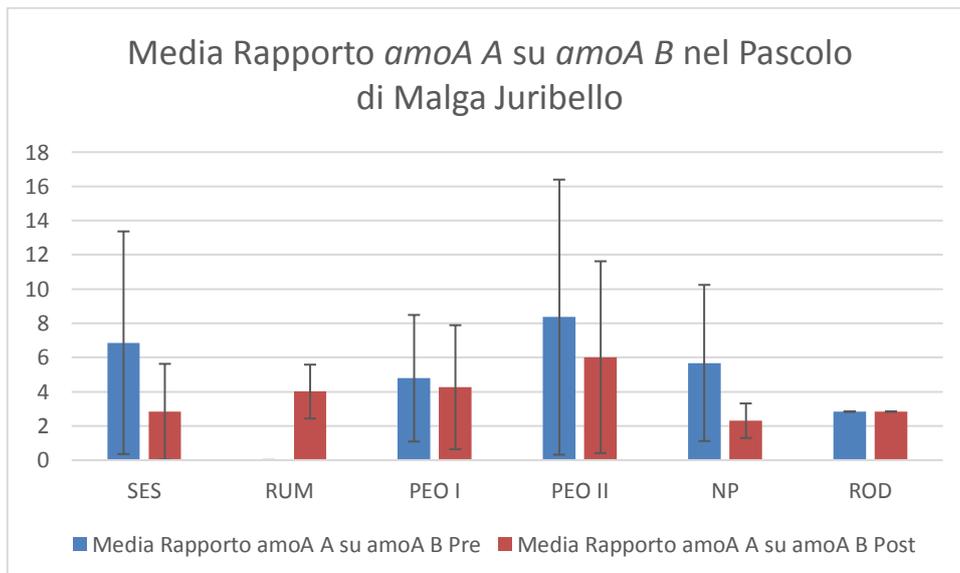


Figure 63 Ortogramma per la media di copie di geni del pascolo di Malga Juribello in scala logaritmica con base neperiana e deviazione standard per il rapporto tra i geni *amoA*