

INDICE

1. Introduzione e scopo della tesi.	3
2. Revisione della letteratura.	6
2.1 Interazione macchina-suolo.	6
2.2 Impatti al suolo.	8
2.3 Conseguenze dei disturbi al suolo.	13
3. Prove sperimentali.	20
3.1. Introduzione.	20
3.2 Analisi dell’impatto al suolo in una pineta del litorale toscano a seguito di un intervento di utilizzazione forestale con un alto livello di meccanizzazione.	21
3.2.1 Materiali e metodi.....	21
3.2.1.2 Area di studio.	21
3.2.1.3 Disegno di campionamento e misure effettuate.	22
3.2.1.4 Estrazione di DNA da suolo e successiva amplificazione per frammenti <i>nifH</i> e <i>amo</i>	24
3.2.1.5 Analisi T-RFLP.	25
3.2.1.6 Clonaggio e analisi di sequenze.	26
3.2.1.7 Analisi statistiche.....	28
3.2.1.8 Analisi degli indici di biodiversità.	28
3.2.2 Risultati.....	30
3.2.2.1. Parametri fisici del suolo.	30
3.2.2.2 Profili T-RFLP e analisi di sequenze.....	31
3.2.2.3 Analisi di spazializzazione della struttura delle comunità microbiche di azotofissatori e nitrificanti.....	36
3.2.2.4 Indici di biodiversità.....	38
3.2.3 Discussione.	39
3.3 Analisi dell’impatto sul suolo causato dal transito con trattore gommato e con trattore cingolato in un popolamento misto di conifere nell’Appennino toscano.	44

3.3.1 Introduzione.....	44
3.3.2 Materiali e metodi.....	44
3.3.2.1 Area di studio.	44
3.3.2.3 Estrazione del DNA da suolo e amplificazioni PCR per i frammenti <i>nifH</i> e <i>amo</i>	47
3.3.2.4 Analisi T-RFLP.	48
3.3.2.5 Analisi statistiche.....	48
3.3.2.6 Analisi degli indici di biodiversità.	49
3.3.3 Risultati.....	49
3.3.3.1 Parametri fisici del suolo.	49
3.3.3.2 Relazione tra la profondità del solco e il numero di passaggi.....	51
3.3.3.3 Comunità batteriche analizzate dai profili T-RFLP.	53
3.3.3.4 Indici di biodiversità.....	56
3.3.4 Discussione.....	57
4. Conclusioni.....	62
5. Bibliografia.....	64
Allegati	75
Allegato 1 - Schema di raccolta ed elaborazione campioni.	75
Allegato 2 - Tabella relativa alle specie di San Rossore.	77
Allegato 3 – Tabella relativa alle specie di Rincine.....	80
Allegato 4 – Banca dati per analisi di sequenza e per la costruzione delle mappe di restrizione per il frammento <i>nifH</i>	83
Allegato 5 – Banca dati per analisi di sequenza e per la costruzione delle mappe di restrizione per il frammento <i>amo</i>	88

1. Introduzione e scopo della tesi.

Il problema relativo all'impatto delle utilizzazioni forestali sull'ambiente risulta essere articolato e complesso. Vengono definiti sistemi di utilizzazione a basso impatto ambientale quelli che non comportano rischi rilevanti per la stabilità del suolo e del soprassuolo (Marchi e Piegai, 2001). Gli stessi autori sostengono che nella realtà non esistono sistemi di lavoro intrinsecamente a basso impatto ambientale validi in tutte le situazioni, ma ci sono diversi sistemi di esbosco e accorgimenti tecnici che permettono di minimizzare l'impatto ambientale.

I principali effetti negativi dei lavori di utilizzazione forestale si hanno a livello del suolo, soprattutto nelle fasi di concentramento ed esbosco. Molti dei danni inoltre possono essere riconducibili anche all'utilizzo dei mezzi meccanici inadatti o ad un loro impiego inadeguato (Spinelli, 1995).

La meccanizzazione all'interno delle utilizzazioni forestali ha visto, negli ultimi decenni, l'impiego e la diffusione di macchine sempre più potenti e pesanti. Il passaggio delle macchine esercita forze verticali e di taglio sul suolo, i cui effetti più comuni sono la compattazione e la formazione di solchi, con conseguente rimescolamento degli orizzonti superficiali.

Il problemi relativi al compattamento e della formazione dei solchi diventano, quindi, aspetti principali di degradazione del suolo, ed hanno come conseguenza la perturbazione delle sue funzioni ecologiche.

Una presa d'atto dei possibili impatti al suolo ad opera dei mezzi utilizzati nelle operazioni di utilizzazione forestale, è dunque fondamentale per organizzare le misure di prevenzione del danno ed una eventuale mitigazione dello stesso.

Nell'ultimo decennio si è quindi evidenziato un crescente interesse per la "forest operation ecology", particolare aspetto delle utilizzazioni forestali che mira allo sviluppo di sistemi e tecniche ecologicamente compatibili, volte a minimizzare le tipologie di impatto (Heinimann, 2007).

Diversi studi hanno quindi preso in esame la valutazione degli effetti delle operazioni forestali, molti anche inerenti agli impatti ambientali di queste ma ancora diversi aspetti non sono proprio del tutto chiari. In particolar modo molto deve essere ancora spiegato sulle varie interazioni tra parametri di diverso tipo in modo da avere un quadro generale sulla complessità della tematica.

Partendo da questo concetto si basa la seguente tesi, ovvero quello di andare a valutare gli effetti di alcune operazioni forestali, con particolare attenzione alla compattazione del suolo, mettendo in relazione diverse categorie di parametri. In questo lavoro, oltre agli effetti delle utilizzazioni sui più importanti parametri fisici del suolo, presi spesso in esame in letteratura, sono stati considerati gli effetti sulla componente microbiologica del suolo, aspetto ancora poco considerato nella ricerca. Per quanto riguarda quest'ultima sono stati presi in esame la comunità dei batteri azotofissatori, in quanto la loro presenza o la loro variazione in numero e abbondanza nel suolo viene facilmente alterata da qualsiasi fattore di disturbo essendo fortemente sensibili alla concentrazione di O₂ e la comunità dei batteri nitrificanti che trasformano l'azoto organico.

Questo tipo di approccio risulta essere innovativo e può dare dunque un contributo importante alla tematica. Il confronto dei risultati relativi a questi parametri, prima e dopo l'utilizzazione, infatti permette di delineare un quadro generale, e a vari livelli, dei cambiamenti e quindi degli impatti che si possono verificare.

Lo studio ha interessato un'area sul litorale e una nell'Appennino della Toscana. Nel primo caso si è trattato di una pineta di pino domestico (*Pinus pinea* L.) all'interno del Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa), dove, su suolo prettamente sabbioso, è stato eseguito un taglio di raso con abbattimento del soprassuolo con un alto livello di meccanizzazione che prevedeva la combinazione tra due tipi di macchine: il Feller per l'abbattimento delle piante e il Forwarder per l'esbosco.

La seconda area ha riguardato invece un cantiere in un popolamento misto di abete rosso (*Picea abies* L.), douglasia (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) e abete bianco (*Abies alba* Mill.), su suolo franco argilloso. In questa situazione è stato valutato l'effetto al suolo del passaggio sia di un trattore gommato che di un trattore cingolato.

Gli scopi del presente studio sono stati dunque:

- i) fare il punto sullo stato delle conoscenze in merito agli impatti sul suolo delle utilizzazioni forestali attraverso un lavoro di analisi e sintesi della letteratura sull'argomento;
- ii) valutare e confrontare le risposte del suolo ai disturbi provocati dai mezzi meccanici in un'utilizzazione basata su una meccanizzazione spinta;

- iii) valutare le differenze negli impatti causati al suolo da mezzi cingolati e gommati;
- iv) affiancare all'analisi dei parametri fisici del suolo le analisi genetiche sulla componente microbiologica dello stesso con particolare attenzione alla comunità degli azoto fissatori e dei nitrificanti.

2. Revisione della letteratura.

2.1 Interazione macchina-suolo.

I veicoli forestali che transitano nelle aree boscate durante le operazioni di concentramento ed esbosco esercitano sollecitazioni verticali e orizzontali, nonché forze di taglio al suolo (Alakukku *et al.*, 2003). La conseguenza più rilevante di queste sollecitazioni si manifesta con l'alterazione e il compattamento del suolo. L'entità degli impatti dipende dalla massa del veicolo, dal carico sugli organi di propulsione, dal tipo di pneumatico, dalla sua pressione di gonfiaggio e dall'area di contatto del veicolo con il terreno (Jansson e Johansson, 1998; Alakukku *et al.*, 2003; Bygdén *et al.*, 2004). La massa dei mezzi forestali è cresciuta negli ultimi decenni ed oggi varia tra i 3 e i 40 Mg (Jansson e Wästerlund, 1999; Eliasson, 2005).

Con il termine area di contatto si definisce la parte del pneumatico o del cingolo direttamente a contatto con il terreno. Per i pneumatici non è semplice calcolarla esattamente in quanto legata alla deflessione del pneumatico stesso, influenzata a sua volta dalle caratteristiche del pneumatico, dalla pressione di gonfiaggio, dal carico e dalla plasticità del terreno (Hallonborg, 1996; Saarihahti, 2002). Ad esempio, una maggiore area di contatto è possibile con una pressione di gonfiaggio bassa, cosa utile in particolare su terreni soffici e un alto carico del pneumatico, . Il movimento dei mezzi forestali avviene su una matrice plastica (il terreno) producendo, nel caso dei pneumatici, una superficie di contatto asimmetrica al loro asse trasversale, ovvero quello perpendicolare al pneumatico (Hallonborg, 1996). Inoltre, se i mezzi si muovono lateralmente su un pendio, l'area di contatto dei pneumatici sarà asimmetrica rispetto all'asse longitudinale del mezzo.

Durante il movimento dei mezzi, inoltre, l'area di contatto varia a seguito di accelerazioni, frenate, e cambiamenti di direzione ed è influenzata inoltre della superficie non regolare delle terreno sul quale transitano. Si possono verificare situazioni in cui si hanno sovrapposizioni di sollecitazioni verticali ed orizzontali, di pressione e taglio provenienti da zone di contatto limitrofe (Alakukku *et al.*, 2003). Hallonborg (1996) ha suggerito alcune formule matematiche per calcolare l'area di contatto, basandosi su modelli ellittici, ma queste spesso richiedono dati di *input* non facilmente acquisibili e che comunque non considerano la variazione dinamica durante gli spostamenti.

Su terreni ripidi, i mezzi cingolati sono i macchinari più impiegati. L'area di contatto, ampia e invariabile, consente di avere una buona aderenza, una bassa pressione unitaria al suolo e una buona stabilità sui pendii (Agherkakli *et al.*, 2010).

La pressione media di contatto al suolo, data dal rapporto tra la massa del veicolo e l'area di contatto, determina lo stress verticale esercitato sul suolo. Nei mezzi gommati, tale pressione unitaria può variare in relazione alle caratteristiche dei pneumatici, alla pressione di gonfiaggio e al carico, e può essere anche inferiore alla pressione di gonfiaggio (Wong, 2008). Il semplice calcolo della pressione statica a terra delle macchine forestali, tuttavia, non è sufficientemente indicativa della pressione dinamica esercitata sul suolo in caso di slittamento (Lysne and Burditt, 1983). Inoltre, la pressione non è al solito distribuita in modo uniforme sulla superficie di contatto e risente in particolare del tipo e delle caratteristiche del pneumatico (rigidità della carcassa, ecc). La pressione massima di contatto al suolo di un pneumatico può essere superiore (anche di dieci volte) a quella media (Burt *et al.*, 1992; Hillel, 1998; Gysi *et al.*, 2001).

Nei veicoli cingolati le pressioni unitarie esercitate al suolo sono al solito inferiori, in particolare per effetto della maggiore superficie di contatto. Questa tipologia di veicolo realizza, evidentemente, una condizione di aderenza totale del trattore il cui peso si scarica in parti uguali sulle due catene, ripartendo, inoltre, su un'ampia superficie il peso stesso che in tal modo grava sul terreno con carichi specifici molto limitati e sensibilmente inferiori a quelli che si hanno nel caso dei trattori a ruote (Pellizzi, 1992).

Le forze di taglio che si verificano al suolo hanno maggior effetto in superficie per poi diminuire in profondità (Koolen *et al.*, 1992) anche se, soprattutto a seguito dello slittamento dei pneumatici (Najafi *et al.*, 2010), effetti marcati si possono verificare anche negli strati sottostanti. Kühner (1997) ha dimostrato e descritto l'effetto dello slittamento al suolo con la conseguente riorganizzazione della struttura dei pori.

Maggiore è la velocità dei veicoli, minore è la durata di carico e di stress che il suolo subisce (Horn *et al.*, 1989; Alakukku *et al.*, 2003).

Tra la letteratura presa in considerazione per la definizione dello stato dell'arte sull'argomento, sono stati selezionati 48 articoli riguardanti prove svolte in campo in diverse condizioni di suoli e tipi di utilizzazioni. L'analisi di questi lavori ha messo in evidenza che una buona parte di questa bibliografia affronta l'impatto al suolo delle operazioni di raccolta omettendo alcuni dati cruciali come: le condizioni del suolo (es. tipo di suolo, umidità del suolo), le caratteristiche della macchina (es. il tipo di pneumatici, la

pressione di gonfiaggio), il sistema di raccolta etc. La mancanza di uniformità nella caratterizzazione degli studi non permette in molti casi un confronto tra esperienze diverse e non consente di “pesare” l’importanza dei diversi fattori che influenzano l’interazione veicolo-suolo.

2.2 Impatti al suolo.

La degradazione di un suolo forestale può essere uno dei maggiori problemi che si verificano a seguito del taglio e della raccolta del materiale legnoso (Krag *et al.*, 1986; Miller e Sirois, 1986; Rab, 1994; Williamson e Neilsen, 2000). L’impiego di macchinari pesanti utilizzati sia per il taglio che per l’esbosco delle piante può portare a cambiamenti significativi nella struttura del suolo (Picchio *et al.*, 2012). L’impatto causato dai veicoli forestali non interessa solo gli orizzonti superiori del suolo, ma anche quelli più in profondità (Lùsher *et al.*, 2010). Il grado e l’entità del danno al suolo dipende da molti fattori, legati (i) alle caratteristiche della macchina (massa totale, carico per asse/ruota/cingolo, area di contatto, ecc.) e (ii) ai parametri del suolo (umidità, pendenza, granulometria, contenuto di sostanza organica).

La mobilità dei veicoli forestali è strettamente correlata all’aderenza che si crea tra l’organo di propulsione e il suolo. (Alakukku *et al.*, 2003). Le relazioni che si instaurano tra l’organo di propulsione e il suolo sono fondamentali per le ripercussioni sullo stato del terreno e sulla stabilità del veicolo (Cavalli, 1991).

Diversi studi hanno valutato l’impatto causato dal passaggio dai veicoli forestali sulla degradazione del suolo a seguito della raccolta meccanizzata (Huang *et al.*, 1996; Ballard, 2000; McNabb *et al.*, 2001; Teepe *et al.*, 2004; Shestak *et al.*, 2005; Schack-Kirchner *et al.*, 2007; Ampoorter *et al.*, 2010; Picchio *et al.*, 2012). La maggior parte di questi lavori si sono concentrati sull’impatto a livello delle proprietà fisiche del suolo stesso. Tra queste, le più importanti, che riflettono la degradazione della struttura del suolo, sono la densità apparente e la porosità (Froehlich *et al.*, 1985; McNabb *et al.*, 2001).

La compattazione del suolo porta infatti ad aumentare la densità apparente e le forze di resistenza al taglio e alla penetrazione (Adams e Froehlich, 1984; Pritchett e Fisher, 1987; Gomez *et al.*, 2002). L’aumento della densità apparente è strettamente legato alla riduzione del volume totale dei pori, che subiscono una alterazione della loro

distribuzione, dimensioni e continuità (Kutřlek *et al.*, 2006), influenzando cosđ le infiltrazioni d'acqua, la ritenzione idrica del suolo e gli scambi gassosi (Dexter, 2004).

Durante le operazioni di raccolta del legname, infatti, le particelle di terreno vengono riorganizzate e il rapporto tra macro- e micro-pori puđ essere notevolmente modificato (Brady e Weil, 2001). Pur considerando il diverso comportamento dei vari tipi di suolo, in generale il compattamento porta ad una riduzione della porositđ totale, ad una riduzione dei macropori ad un aumento dei micropori. I macropori hanno grande importanza per l'infiltrazione dell'acqua, lo scambio di gas con l'atmosfera e la penetrazione delle radici e la loro alterazione (Quesnel e Curran, 2000; Kutřlek *et al.*, 2006) puđ influenzare la rigenerazione e la crescita delle piante (Gomez *et al.*, 2002). Per convenzione si considerano macropori quelli con diametro superiore a 8 μm , micropori quelli con diametro inferiore a 8 μm .

La riduzione della porositđ del suolo puđ anche alterare l'ambiente microbico (van der Linden *et al.*, 1989; Kaiser *et al.*, 1991) portando allo sviluppo di una comunitđ microbica basata su specie che tollerano condizioni anossiche (Frey *et al.*, 2009). Quando la porositđ del terreno scende sotto il 10% del volume totale, l'attivitđ microbica puđ esserne fortemente limitata (Brady e Weil, 2002). L'impatto della compattazione del suolo sulle proprietđ fisiche ě stata frequentemente dimostrata (McNabb *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2007; Ampoorter *et al.*, 2010), ma pochi studi hanno esaminato l'impatto sulla componente biologica del suolo. Tuttavia, con l'avvento di strumenti molecolari, vi sono crescenti evidenze sugli effetti della compattazione del suolo sulla struttura microbica (Frey *et al.*, 2009, 2011; Hartmann *et al.*, 2012, 2014).

I parametri che maggiormente vengono presi in considerazione per la valutazione degli effetti del passaggio delle macchine sul terreno forestale sono: (i) struttura e tessitura del suolo; (ii) topografia; (iii) sostanza organica; (iv) umiditđ del suolo; (v) peso delle macchine; (vi) intensitđ del traffico.

La predisposizione di un suolo alla compattazione ě fortemente legata alla sua struttura, in particolare alla capacitđ degli aggregati di resistere alle pressioni e a non rompersi (Page - Dumrose *et al.*, 2006). In linea generale si presuppone che i terreni argillosi o argillo limosi siano maggiormente sensibili alla compattazione, rispetto ai suoli sabbiosi (Hillel, 1998 e Fisher e Binkley, 2000; McNabb *et al.*, 2001; Berli *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2008; Magagnotti *et al.*, 2012). Gomez e collaboratori (2002) hanno dimostrato che valori elevati di densitđ apparente, e decisamente minori di porositđ, si

verificano dopo il passaggio dei mezzi su suoli argillosi. Smith (2003) sostiene che la presenza di un terreno argilloso influenza molto l'aumento della resistenza alla penetrazione dopo il passaggio di mezzi meccanici. Tuttavia sia Brais e Camirè (1998) che successivamente Ampoorter e collaboratori, (2007) affermano che anche un terreno sabbioso può subire dei cambiamenti a seguito di una raccolta meccanizzata. In una recente meta-analisi, Ampoorter e collaboratori (2012) hanno dimostrato che l'impatto sui terreni argillosi non è significativamente diverso dall'impatto sui terreni sabbiosi. Gli stessi autori suggeriscono tuttavia una certa cautela nell'analisi dei risultati del loro studio poiché i dati di partenza utilizzati non erano molto numerosi. Questi risultati contrastanti suggeriscono l'esigenza di ulteriori approfondimenti sull'argomento.

Anche la topografia contribuisce sostanzialmente sugli effetti causati al suolo dal passaggio dei mezzi meccanici. Infatti alcuni studi recenti hanno dimostrato che il compattamento del suolo causato dai mezzi di esbosco aumenta all'aumentare della pendenza (Agherkakli *et al.*, 2010; Jourgholami *et al.*, 2014).

Altro parametro importante risulta essere la sostanza organica presente nel suolo, in quanto è il principale fattore responsabile di una buona struttura nei suoli forestali, soprattutto negli strati superiori, e svolge un ruolo fondamentale nel contrastare la compattazione (Aragon *et al.*, 2000; Ellis Sch *et al.*, 2000; Johnson e Curtis *et al.*, 2001; Arthur *et al.*, 2013). Una buona presenza di materia organica può diminuire la compattabilità aumentando la resistenza alla deformazione. Per questo motivo può essere anche più importante della distribuzione granulometrica (tessitura) nel rendere il suolo più resistente al compattamento (aumentando la stabilità degli aggregati) (Soane, 1990). Diversi autori sostengono che i valori di compattazione del suolo sono inversamente proporzionali al contenuto di sostanza organica presente nel terreno (Ball *et al.*, 1989; Soane, 1990; Jurgensen *et al.*, 1997; Aragon *et al.*, 2000; Ellies Sch *et al.*, 2000; Johnson and Curtis, 2001; Arthur *et al.*, 2013). La raccolta del legname può indurre cambiamenti rilevanti nel suolo a livello di abbondanza e qualità di materia organica (Jurgensen *et al.*, 1997; Johnson and Curtis, 2001), con conseguenze spesso negative sulla struttura e sulla suscettibilità alla compattazione.

Il contenuto di umidità nel suolo al momento del passaggio è un altro aspetto rilevante in quanto comporta un'eventuale riduzione delle forze di attrito tra le particelle del terreno e di conseguenza una riduzione della capacità portante del terreno (McDonald e Seixas, 1997; McNabb *et al.*, 2001; Raper *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Ampoorter *et al.*,

2012). Il movimento dei mezzi su un suolo con umidità di circa il 60% della capacità di campo, può portare a seri problemi di compattamento (Raper, 2005). La compattazione del suolo, in termini di densità apparente, aumenta con il tenore di umidità fino ad un livello critico, detto anche “umidità critica”, e poi tende a diminuire con ulteriori aumenti di umidità (McNabb *et al.*, 2001; McDonald e Seixas 1997; Han *et al.*, 2006). Contrariamente, quando congelati, i suoli sono poco sensibili al passaggio dei mezzi (Šušnjar *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda l’effetto del tipo di organi di propulsione dei veicoli forestali sulla compattazione, la bibliografia ha mostrato carenze e risultati contrastanti. Jansson e Johansson, (1998) hanno valutato le variazioni di densità apparente dopo il passaggio di un mezzo cingolato e uno gommato ed hanno verificato che lo stesso effetto alla stessa profondità si verificava dopo 8 passaggi nel caso del cingolo e dopo 6 passaggi nel caso del gommato, mettendo in evidenza una più rapida degradazione del suolo nel caso di mezzi gommati. Sheridan (2003), al contrario, non ha trovato differenze significative, nel lungo periodo dopo il compattamento, relative alla variazione della densità apparente, tra veicolo gommato e cingolato, nonostante la pressione “statica” al suolo fosse maggiore del 30% nel caso del gommato. Ulteriori studi specifici sul confronto tra mezzi sono necessari per avere un panorama di risultati più ampio e dettagliato.

La massa della macchina, in particolare la pressione media di contatto sul terreno, è fondamentale in quanto correlata all’entità della compattazione (Sakai *et al.*, 2008). Questo parametro, definito come il rapporto tra la massa della macchina e l’area di contatto a terra dei pneumatici o dei cingoli, rappresenta la pressione verticale e quindi la compattazione potenziale (Ampoorter *et al.*, 2010). Tanto maggiore è la pressione di contatto, tanto maggiore sarà l’impatto al suolo (McDonald *et al.*, 1995). Una parentesi merita di essere aperta per quanto riguarda la pressione di gonfiaggio dei pneumatici. Alakukku e collaboratori (2003) sostengono che una bassa pressione è un valido strumento per ridurre la compattazione al suolo. Tuttavia Eliasson (2005) non ha trovato nessuna influenza significativa della pressione sulla variazione della densità apparente del suolo, nonostante l’interazione tra il numero di passaggi e la pressione di gonfiaggio dei pneumatici fosse significativa.

Diversi studi sostengono che la maggior parte degli impatti al suolo si verificano dopo i primi passaggi (Williamson e Neilsen, 2000; Wallbrink *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006). In base al numero di passaggi, Jourgholami e collaboratori (2013) hanno rilevato che le variazioni di densità apparente e porosità sono state considerevoli, rispetto al

controllo, fino a cinque passaggi, per poi continuare a variare in modo limitato per i successivi passaggi. Gli stessi autori hanno verificato che gli aumenti della resistenza alla penetrazione si sono manifestati in modo considerevole fino a dopo dieci passaggi. Negli strati di suolo compresi tra 10-30 cm, la compattazione sembra aumentare fino al terzo passaggio, raggiungendo quasi il 90 % del livello di compattazione finale (McNabb *et al.*, 2001). I risultati degli studi su questo tema concordano sul fatto che il livello di compattamento del suolo è strettamente legato al numero di passaggi dei mezzi meccanici (McDonald *et al.*, 1995; Jansson e Johansson, 1998; Nugent *et al.*, 2003, Bygdén *et al.*, 2004; Eliasson, 2005; Eliasson e Wästerlund, 2007).

Un altro visibile impatto al suolo che si può verificare dopo il passaggio di mezzi forestali è la formazione di solchi all'interno delle piste forestali. La formazione di questi solchi è il risultato degli spostamenti delle particelle di suolo, verticali ed orizzontali sia al centro che ai lati della pista e sono associati a sollecitazioni di taglio e di compressione del terreno (Horn *et al.*, 2007). Vengono definiti solchi, gli avvallamenti di almeno 5 cm di profondità provocate dal passaggio dei mezzi gommati o cingolati e che spesso si formano con condizioni di elevato contenuto di umidità (Naghdi *et al.*, 2009). La presenza di questi solchi è la prova che il carico del veicolo ha superato la capacità portante del terreno (Muro, 1982; Yong *et al.*, 1984). La profondità e l'estensione di questi sono collegati agli stessi caratteri elencati per la compattazione e più in particolare a: (i) caratteristiche del mezzo (peso e tipo di organi di propulsione), (ii) pendenza del terreno; (iii) contenuto di umidità nel suolo al momento del passaggio; iv) numero di passaggi dei mezzi (McDonald *et al.*, 1995; Jansson e Johansson, 1998; McNabb *et al.*, 2001; Bygdén *et al.*, 2004; Eliasson, 2005; Eliasson e Wästerlund, 2007). La profondità del solco e l'altezza delle creste che si formano ai suoi lati sono le principali caratteristiche visibili per valutare il danno indotto al suolo (Lacey and Ryan, 2000; Jansson and Johansson, 1998). Generalmente i solchi sono più marcati nel caso del passaggio dei mezzi gommati rispetto a quelli cingolati (Neruda *et al.*, 2010).

A causa della superficie di contatto inferiore con il terreno, i pneumatici tendono a creare solchi più profondi (Bygdén *et al.*, 2004) rispetto ai cingoli (Jansson e Johansson, 1998). Diminuendo la pressione dei pneumatici la profondità del solco diminuisce (Foltz, 1995; Neri *et al.*, 2007) in quanto una pressione di gonfiaggio inferiore implica una più ampia superficie di contatto tra pneumatico e terreno e quindi una minore pressione unitaria. Tuttavia ci sono risultati contrastanti riguardo alla pressione di gonfiaggio. Infatti,

Eliasson e collaboratori (2005) non riscontrano alcun effetto significativo tra il livello di pressione e profondità del solco. La profondità del solco può essere direttamente proporzionale al peso della macchina (Jansson e Wasterlund, 1999).

Jansson e Johansson (1998) riportano che le profondità dei solchi dopo due passaggi di un mezzo gommato sono confrontabili con la profondità ottenuta dopo otto passaggi di un mezzo cingolato. Inoltre gli stessi autori sostengono che i veicoli gommati, inoltre, creano disturbi maggiori agli strati superficiali del suolo rimescolando maggiormente gli strati organici superiori con i sottostanti strati minerali a differenza dei mezzi cingolati che invece sembrano creare meno danni agli strati organici superficiali.

Agherkakli e collaboratori (2010) e Najafi e collaboratori (2010) hanno affermato che anche il fattore pendenza risulta essere rilevante sulla profondità del solco; molto probabilmente perché la componente verticale della forza di carico viene distribuita su una superficie più piccola. La profondità del solco risulta quindi essere direttamente proporzionale all'aumento della pendenza. Naghdi e collaboratori (2009) si sono soffermati sullo spostamento laterale di volume di suolo a seguito della formazione dei solchi ed hanno verificato che il volume di suolo spostato era maggiore dopo il passaggio di un gommato rispetto al passaggio di un mezzo cingolato.

Ultimo aspetto, ma non per importanza, spesso affrontato e tenuto in considerazione è quello del contenuto di umidità al momento dei lavori in bosco. Quando lo stato idrico del suolo è vicino o superiore alla capacità di campo, sia pneumatici che cingoli possono provocare disturbi con formazione di solchi, piuttosto che uno stato di compattamento (Hillel, 1998; Williamson e Neilsen, 2000; Naghdi *et al.*, 2009). Come per il compattamento, anche per la formazione dei solchi un maggior contenuto di umidità al momento del passaggio porta a maggiori danni al suolo.

2.3 Conseguenze dei disturbi al suolo.

Le conseguenze che le operazioni forestali possono avere sul suolo, siano esse confinate o diffuse, possono implicare un aumento proporzionale di effetti negativi, non solo sulle proprietà fisiche ma anche su quelle biologiche (Carman, 2002; Bagheri *et al.*, 2011) e possono inoltre influire sull'aumento del deflusso superficiale, dell'erosione del suolo e della lisciviazione dei nutrienti e dei gas (Worrell e Hampson, 1997; Powers *et al.*, 2005). Si possono avere ripercussioni anche sulla crescita delle piante, dovute a danni alle

radici con riduzioni del livello di produttività (Rab 1996; Williamson e Neilsen, 2000 Brais, 2001; Gomez *et al.*, 2002; Heninger *et al.*, 2002; Ares *et al.*, 2005; Christopher and Visser, 2007). I rischi di degradazione del suolo sono, in realtà, insiti in quasi tutte le operazioni di utilizzazione forestale, ma sono più marcati soprattutto operando in situazioni fisiografiche difficili e in terreni con forte pendenza (Agherkakli *et al.*, 2010; Najafi *et al.*, 2010 Naghdi *et al.*, 2009). L'impatto sull'ecosistema quindi può essere notevole (Grigal, 2000; Frey *et al.*, 2009, Picchio *et al.*, 2012).

La proprietà fisica del suolo presa maggiormente in considerazione è la porosità, la cui diminuzione e/o perdita porta a conseguenze negative a livello di infiltrazione, ritenzione e movimento dell'acqua (Frey *et al.*, 2009). L'alterazione della struttura del suolo e riduzione della porosità riduce il tasso di infiltrazione di acqua in profondità (Rab, 1996). Terreni compattati trattengono più acqua alla capacità di campo rispetto ai terreni non compattati (Currie, 1984), sebbene questo non implichi che l'acqua sia più disponibile per le piante. Infatti, i micropori (diametro dei pori inferiore a 8µm) aumentano per effetto della compressione a scapito dei macropori (diametro dei pori superiore a 8µm). Questi ultimi presentano minore capacità di trattenere acqua rispetto ai micropori. Quindi un aumento dei micropori porta ad una maggiore capacità del suolo di trattenere acqua; tuttavia essi possono trattenere l'acqua con una forza maggiore alla capacità di assorbimento delle radici.

L'erosione superficiale è un'altra conseguenza del disturbo del suolo ed è spesso legata alla formazione dei solchi, all'interno dei quali l'acqua può concentrare la sua azione erosiva (Startsev e McNabb, 2000) con il deflusso rapido delle acque meteoriche e il trasporto in sospensione delle particelle di suolo (Adams e Froehlich, 1981). La compattazione poi aumenta l'erodibilità dei suoli, aumentando la mobilità dell'argilla e i possibili ristagni (Herbauts *et al.*, 1996; Rab, 1996). In situazioni di terreno pianeggiante, la presenza di solchi crea una sorta di sifone per le acque superficiali e nel caso queste permangono per diverso tempo, si creano delle condizioni anossiche all'interno degli stessi solchi (Rab, 1996 e Herbauts *et al.*, 1996).

Conlin e van den Driessche (1996, 2000) e Frey e collaboratori (2009) hanno trovato una diminuzione significativa dei livelli di O₂ nel suolo a seguito della compattazione. Tale diminuzione era tuttavia piccola entità e comunque al di sotto della soglia del 6-10% di riduzione della concentrazione di O₂ ritenuta critica per limitare la crescita delle radici delle piante in terreni compattati (Schumacher e Smucker 1981; Grant

1993). Il livello di permeabilità all'aria è stato valutato da Frey e collaboratori (2009) su tre livelli di compattamento del suolo (leggero, moderato e forte). Gli autori hanno trovato che la permeabilità all'aria rimaneva su valori sufficienti per lo scambio gassoso fino ad un livello di moderato compattamento; mentre in una situazione più critica la permeabilità si riduceva anche del 96%.

La compattazione influenza anche la concentrazione di CO₂ nel suolo. Diversi autori riportano aumenti di concentrazione di CO₂ a seguito del passaggio dei mezzi al suolo (Erler and Güldner, 2002; Shestak e Busse, 2005; Novara *et al.*, 2012; Goutal *et al.*, 2012; Hartman *et al.*, 2014). La produzione di CO₂ è legata alla decomposizione della materia organica e alla respirazione delle radici delle piante (Qi *et al.*, 1994). Conlin (2000) e van den Driessche (2000) hanno dimostrato che sia la compattazione che la formazione dei solchi hanno effetti significativi sulla concentrazione di CO₂ del suolo. Anche Goutal e collaboratori (2013, b) sostengono che un suolo compattato presenta un aumento di CO₂ e una diminuzione di O₂, rispetto a condizioni di suolo non compattato, dovuti ad una diminuzione della diffusione dei gas. Altro elemento che aumenta tale concentrazione è il traffico dei mezzi (Magagnotti *et al.*, 2012).

L'impatto negativo della compattazione del suolo sulle caratteristiche fisico-chimiche del suolo è stato valutato molto negli ultimi anni (McNabb *et al.*, 2001; Radford *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2007; Ampoorter *et al.*, 2010). Al contrario pochi lavori hanno riportato effetti significativi a livello della componente microbica dei suoli (Dick *et al.*, 1988; Jordanet *et al.*, 2003; Schnurr-Pütz *et al.*, 2006). La maggior parte dei lavori pubblicati, relativi ai cambiamenti della componente microbica del suolo post compattazione, hanno presentato effetti non significativi (Jordan *et al.*, 1999; Chow. *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Shestak e Busse, 2005; Busse *et al.*, 2006; Mariani *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2008). Nel complesso però possiamo affermare che la compattazione del suolo tende a rallentare l'attività microbica, soprattutto per la diminuzione della porosità totale e della distribuzione dei pori (Wronski e Murphy, 1994; Startsev *et al.*, 1998) che si tende a creare. La diminuzione della porosità si traduce in una riduzione degli scambi gassosi con l'atmosfera e una conseguente riduzione dell'ossigeno nel suolo. Questo fenomeno crea una selezione a favore dei batteri anaerobi (Ponder e Tadros, 2002; Schnurr-Pütz *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2014). D'altra parte batteri capaci di respirazione anaerobia, tra cui i riduttori di solfato e zolfo, possono essere anche favoriti dalla compattazione del suolo a causa delle condizioni anossiche, ovvero in assenza di ossigeno (Bakken *et al.*, 1987;

Ponder e Tadros, 2002; Schnurr-Pütz *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2014). La diffusione dell'ossigeno nei terreni compattati infatti è limitata e diminuisce l'attività dei microrganismi aerobi (Schnurr-Pütz *et al.*, 2006). Anche Tan e collaboratori (2008) e Frey e collaboratori (2009) hanno verificato una diminuzione sia dell'attività enzimatica (di proteasi, deidrogenasi, fosfatasi e amidasi) che della biomassa microbica su suoli compattati. Il carbonio della biomassa microbica tende ad essere in genere inferiore nei terreni compattati (Frey *et al.*, 2009) sia in termini di biomasse batteriche che fungine. Specie batteriche e fungine subiscono inoltre effetti rilevanti dalla combinazione tra la perdita di sostanza organica (per esempio a seguito di un taglio) e una situazione di compattamento. Nel caso dei funghi (Hartman *et al.*, 2012) spesso si può rilevare addirittura più influente la rimozione di sostanza organica sulla variazione in composizione specifica. A proposito di questo Hartman e collaboratori (2014) hanno trovato che la maggior parte dei taxa fungini risultano significativamente alterati dalla compattazione del suolo. Generalmente i Basidiomiceti (in particolare i funghi ectomicorrizici) sembrano subire un impatto negativo, che si traduce in una minor presenza a seguito di una condizione di asfissia, a differenza degli Ascomiceti (in particolare i funghi saprofiti) che invece sembrano favoriti da questa condizione. Frey e collaboratori (2011) e Hartman e collaboratori (2012) sostengono che una maggior presenza di gruppi microbici come i nitrificanti e i metanogeni può essere sintomo di una situazione di compattamento del terreno. Hartman e collaboratori (2012) affermano inoltre che le specie simbiotiche e saprofite sembrano essere tra i gruppi microbici più sensibili alle variazioni in termini di compattazione e quindi sono ritenuti potenziali indicatori per il monitoraggio del recupero dei sistemi forestali. Alcuni cambiamenti strutturali nella componente microbica sono spesso affiancati a cambiamenti significativi nei processi pedogenetici del suolo, con conseguente diminuzione di biossido di carbonio e un aumento di emissione del metano e protossido di azoto (Hartman *et al.*, 2014).

Con il recente avvento delle analisi di metabolomica, è sempre più evidente che gli effetti della compattazione del suolo sulla struttura e funzione microbica sono probabilmente sostanziali e di lunga durata (Frey *et al.*, 2009, 2011; Hartmann *et al.*, 2012). Proprio grazie a queste nuove tecnologie Hartman e collaboratori (2014) hanno affermato che le comunità microbiche mostrano una certa attività di recupero, se il livello di compattamento non è stato eccessivo; diversa è la situazione con un forte livello di compattamento. Anche l' α diversity può in qualche modo avvantaggiarsi dalla

compattazione ma spesso in tempi lunghi (Hartman *et al.*, 2014). La relazione tra la struttura e le funzioni delle comunità microbiche nei suoli forestali compattati dovrà comunque essere ancora molto indagata e analizzata.

Gli effetti della compattazione, e dei disturbi al suolo in generale, sono stati valutati anche in relazione alla crescita delle radici. Diversi autori hanno dimostrato una diminuzione dello sviluppo delle radici a seguito di compattamento o formazione di solchi (Taylor e Brar, 1991; Murach *et al.*, 1993; Schack-Kirchner, 1994; Gaertig, 2002; Schaeffer *et al.*, 2001). La crescita ridotta e la minor penetrazione delle radici primarie nel terreno compattato possono indurre un assorbimento inferiore di sostanze nutritive e di acqua (Kozlowski, 1999). Lo stesso autore si sofferma anche su un eventuale problema di assimilazione di ormoni e dei principali nutrienti minerali che possono essere fortemente limitati, sempre per la formazioni di situazioni anossiche. Recenti studi hanno individuato un alto grado di sito-specificità tra la compattazione del suolo e le fasi di sviluppo delle piante (Brais, 2001; Gomez *et al.*, 2002; Smith, 2003). Impattando la crescita delle radici la compattazione può avere un effetto negativo sulla pianta, limitandone lo sviluppo (Whalley *et al.*, 1995). Ares *et al.*, (2005) hanno monitorato la crescita di un popolamento e le variazioni delle proprietà fisiche del suolo a seguito di un esbosco. I risultati sono stati un aumento della densità apparente del suolo, legato ovviamente ad una riduzione della porosità, soprattutto dei pori con diametro maggiore di 8 μm , ed infine un aumento della ritenzione idrica. In queste condizioni di suolo lo studio ha rilevato effetti negativi sull'altezza e sul diametro delle piante. La maggior resistenza alla penetrazione, seguente al compattamento, è il responsabile di questi effetti negativi relativi ad altezza e diametro delle piante (Taylor e Brar, 1991) e spesso un valore di densità apparente di 2.5 MPa è sinonimo di questo (Greacen e Sands, 1980; Whalley *et al.*, 1995). Come per le radici, anche per la crescita delle piante sono stati effettuati diversi studi (Brais, 2001; Gomez *et al.*, 2002; Heninger *et al.*, 2002; Smith, 2003; Ares *et al.*, 2005) i quali affermano che vi è, tuttavia, un'alta sito-specificità da parte della crescita dell'albero a seguito della compattazione del suolo. L'argomento comunque ancora non è chiaro e necessita di ulteriori indagini.

Un alto livello di compattazione può influenzare negativamente anche la rinnovazione del bosco (Figura 1), inibendo la germinazione dei semi e la crescita delle piantine (Pinard *et al.*, 2000; Williamson e Neilsen, 2000). Effetti negativi si possono avere anche dopo cinque anni (Labelle *et al.*, 2011).

Figura 1 *Effetti negativi sulla rinnovazione del bosco a seguito di un alto livello di compattazione del suolo.*



Le perturbazioni al suolo però possono anche apportare degli effetti positivi come ad esempio la germinazione dei semi (Archibold, 1989 e Halpern *et al.*, 1999b), la rinnovazione naturale di particolari specie arboree (Roberts e Dong, 1993) e, un leggero rimescolamento degli orizzonti organici, può migliorare lo stato nutritivo aumentando la mineralizzazione della stessa sostanza organica. In un terreno eccessivamente drenato, con una struttura grossolana, un leggero livello di compattamento può essere positivo per la componente biotica in quanto migliora la ritenzione idrica del suolo stesso. Pochi sono però i lavori legati agli aspetti positivi e/o migliorativi sul suolo quindi c'è necessità di chiarimenti e approfondimenti.

Dall'analisi della bibliografia sono emersi diversi aspetti che richiedono approfondimenti della ricerca sugli impatti al suolo dei mezzi forestali. Tra i diversi punti critici per lo sviluppo dell'attività di ricerca si è scelto di approfondire e valutare le ripercussioni, a seguito di interventi di utilizzazione forestale, sui parametri fisici, richiamati spesso in letteratura, e su quelli biologici, non ancora molto approfonditi, con riferimento in particolare a: i) utilizzazioni a meccanizzazione spinta; ii) tipologia di organi

di propulsione. Nel capitolo successivo verranno presentati due studi nel quale sono stati eseguiti i rilievi a tal fine.

3. Prove sperimentali.

3.1. Introduzione.

I campionamenti relativi alle prove sperimentali di questa tesi hanno preso in considerazione gli effetti del transito su suolo forestale di macchine “operatrici” caratteristiche di una meccanizzazione spinta e quelli di macchine “operatrici tradizionali” con organi di propulsione diversi. In entrambi i casi sono state valutate le modifiche sia delle proprietà fisiche del suolo che meglio spiegano il livello di compattamento (densità apparente e porosità), che i cambiamenti a livello di forze di resistenza del suolo (resistenza al taglio e alla penetrazione). Ulteriori analisi hanno previsto lo studio delle comunità microbiche del suolo, attraverso analisi molecolari, al fine di valutare anche il cambiamento a livello della componente microbica in quanto descritta come buon indicatore delle variazioni di qualità del suolo (Marshall, 2000) e che risulta essere altamente, dipendente dalla struttura fisica dei pori (Frey *et al.*, 2009).

1. Nel primo caso si è trattato quindi di valutare gli impatti su terreno prettamente sabbioso dopo un taglio raso con abbattimento del soprassuolo effettuato con un alto livello di meccanizzazione che prevedeva la combinazione tra due tipi di macchine: il feller per l’abbattimento delle piante e il forwarder per l’esbosco.
2. Nel secondo caso invece è stato fatto un confronto tra gli effetti causati dal transito di trattori gommati e cingolati, quindi in una situazione di livello di meccanizzazione intermedio, sul suolo.

3.2 Analisi dell'impatto al suolo in una pineta del litorale toscano a seguito di un intervento di utilizzazione forestale con un alto livello di meccanizzazione.

Gli obiettivi di questo studio sono stati quelli di valutare l'impatto della raccolta del legname, a seguito di un taglio raso a strisce in una pineta di *Pinus pinea* L., sul suolo. In particolare, sono state analizzate le caratteristiche fisiche e biologiche del terreno, insieme all'interazione tra esse, a seguito del passaggio dei mezzi forestali. Le comunità microbiche del terreno sono state determinate mediante analisi molecolari (T-RFLP) e ne è stata analizzata la loro distribuzione spaziale, tramite analisi della struttura e spazializzazione della diversità genetica in particolare con il software Geneland.

3.2.1 Materiali e metodi.

3.2.1.2 Area di studio.

L'area di studio si trova in provincia di Pisa, sul litorale toscano all'interno del Parco Regionale di Migliarino - San Rossore – Massaciuccoli. Questa è rappresentata da una pineta di pino domestico (*Pinus pinea* L.), di età compresa tra 100 e 120 anni, con densità di circa 200 p.te /ha e fertilità media della stazione. Nel piano dominato si ha la presenza di alcune piante di leccio (*Quercus ilex* L.) e di farnia (*Quercus robur* L.) ed il sottobosco è caratterizzato da *Erica scoparia* L. e *Phillyrea latifolia* L., con copertura continua di ligustro (*Ligustrum vulgare* L.) e biancospino (*Crataegus monogyna* Jacq.). Il clima è tipicamente mediterraneo con temperature medie annuali che vanno da 11,35° C a 19,62° C e precipitazioni medie annuali di 911,8 mm. La distribuzione mensile delle piogge è quella tipica mediterranea, presentando il massimo autunnale nel mese di ottobre (134,2 mm) e il minimo estivo in luglio (22,4 mm). Il suolo è sabbioso, poco calcareo e il terreno è pianeggiante, al livello del mare, con un'alternanza di dune e interdune.

In questa area l'intervento selvicolturale è stato un taglio raso a strisce alternate di dimensioni pari a circa 40 m x 50 m, effettuato in due diversi periodi, nel 2006 e nel 2011. Le operazioni di utilizzazione, sia nel 2006 che nel 2011, sono state effettuate basandosi su un alto livello di meccanizzazione che combinava due tipi di macchine: un feller (John Deere 759J) per l'abbattimento delle piante e un forwarder (John Deere 1410D) per

l'esbosco (Tabella 1). Gli interventi sono stati eseguiti da una ditta privata di utilizzazione e questa ha provveduto a rilasciare le piante di latifoglie presenti (soprattutto *Quercus ilex* L.) durante le operazioni di taglio. In totale sono state utilizzate due aree nel 2006 e due nel 2011. A breve distanza dalle strisce sottoposte al taglio è stata individuata un'area con caratteristiche e dimensioni simili da utilizzare nello studio come area di controllo e quindi per quantificare le variazioni in termini proprietà fisiche e microbiologiche a seguito dell'intervento.

Tabella 1. Scheda tecnica dei mezzi forestali impiegati nel cantiere con un alto livello di meccanizzazione.

Macchina	Organi di propulsione	Dimensioni (m)		Massa a vuoto (t)	Massa a pieno carico (t)	Diametro massimo p.te (cm)	Cingolato	Pressione al suolo (kPa)			
		Largh.	Lungh.					Gommato			
								Ant. scarico	Post. carico	Ant. scarico	Post. carico
Feller	Cingoli	4,41	3,15	27,8	-	56	59,3	-	-	-	-
Forwarder	gommato (8WD)	10,4	3,07	17,5	31,4	-		51	55	35	101

3.2.1.3 Disegno di campionamento e misure effettuate.

Il disegno di campionamento prevedeva misure e prelievi in due aree sottoposte al taglio nel 2006, in due aree sottoposte al taglio del 2011 e in un'area indisturbata, l'area di controllo. All'interno di ogni area sono state effettuate le stesse misure e prelievi di campioni di suolo per le successive analisi (Allegato 1), al fine di rilevare gli effetti del passaggio dei mezzi sulle caratteristiche del suolo. I parametri considerati sono stati la densità apparente, la porosità, la resistenza al taglio e alla penetrazione il pH e l'analisi della componente microbiologica del suolo.

Per il campionamento in ogni area sono stati tracciati due transect di 30 m seguendo una direzione parallela al lato più lungo delle aree. Lungo i transect sono state effettuate le misure ed i prelievi a distanze di 2 m lungo i transect per un totale di 30 punti di campionamento per area.

In ogni punto di campionamento è stato effettuato il prelievo di campioni di suolo utilizzando un cilindro di metallo (alto 8,5 cm e largo 5 cm). Per considerare esclusivamente il suolo, e quindi non includere lo strato relativo all'humus, è stato

necessario rimuovere i primi 2 cm di suolo prima del campionamento. I campioni di suolo sono stati chiusi in sacchetti di plastica subito dopo il prelievo, numerati e trasportati in laboratorio per le successive analisi. I campioni freschi sono stati utilizzati inizialmente per determinare i parametri fisici del terreno e successivamente sono stati congelati a -80 ° C per le analisi molecolari.

In prossimità dei punti di prelievo dei campioni di suolo sono stati misurati i valori di resistenza al taglio e di resistenza alla penetrazione rispettivamente tramite uno scissometro (Sciss-S100; GEONOR 72412) ed un penetrometro (Pen-P100; TONS/FT²). Anche per questi parametri sono state fatte 30 misure per area. Infine, all'interno del foro rimasto dopo il prelievo dei campioni sono stati rilevati anche i valori di temperatura e umidità del terreno mediante il kit W.E.T Sensor Kit (Delta-T Devices).

In laboratorio, per ogni campione di suolo è stato misurato il peso fresco, utilizzando una bilancia METTLER PC 4400 (Delta Range ®), e successivamente posti in stufa per 16 h a 105°C. Al termine dell'essiccazione i campioni sono stati nuovamente pesati con la stessa bilancia per determinare il peso secco. Utilizzando i valori di peso secco ed il volume del cilindro impiegato per il campionamento (158,96 cm³) è stato successivamente calcolato il valore di densità apparente (BD) di ogni campione. La porosità (P) dei campioni di suolo è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$P = ((\text{densità reale} - \text{densità apparente})/\text{densità reale}) \times 100$$

dove la densità reale del suolo rappresenta la densità delle particelle misurata con un picnometro (Multipycnometer, Quantachrome); questo valore corrisponde a 2,65 mg m⁻³.

Al termine di queste misure, in laboratorio, per ogni campione, è stato calcolato il valore di pH utilizzando 10 g di suolo lasciati depositare per 24 h in 25 ml di H₂O demineralizzata e successiva lettura, dopo 24 h, con piaccametro (XS® ph 510).

3.2.1.4 Estrazione di DNA da suolo e successiva amplificazione per frammenti *nifH* e *amo*.

Da ogni campione di suolo è stata eseguita un'estrazione di DNA totale utilizzando 5 g di suolo (prelevato in modo casuale all'interno di ogni singolo campione) seguendo il protocollo di Porteous e collaboratori (1997) modificato.

Il DNA estratto è stato amplificato mediante NESTED-PCR di un frammento di 360 bp del gene *nifH*. È stata utilizzata una NESTED-PCR con *primer* degenerati, in quanto il gene *nifH* è una sequenza nucleotidica altamente polimorfica e quindi l'utilizzo di *primer* degenerati avrebbe permesso una più alta probabilità di amplificazione del frammento da specie microbiche diverse, ma con possibile perdita di specificità del prodotto. La NESTED-PCR che prevede due amplificazioni: una con una coppia di *primer* complementari a siti esterni al frammento e una successiva con una coppia di *primer* interni al primo prodotto, permette di ottenere una maggiore specificità del prodotto di amplificazione.

La prima amplificazione per *nifH* è stata eseguita utilizzando come *primer forward* 19F (5'- GCIWTYTAYGGIAARGGIGG) (Ueda *et al.*, 1995) e come *primer reverse nifH* 3 (5'-ATRTTRTTNGCNGCRTA) (Zani *et al.*, 2000). Questa reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando: 2 µl di campione di DNA (10 ng/µl), 40 pmol di ciascun *primer*, 2,5 mM MgCl₂ (Life Technologies) 200 µM di ogni dNTP (Life Technologies), Buffer 1X (Life Technologies) e 2,5 U di Platinum® Taq DNA polimerasi (Life Technologies). in un volume finale di reazione di 50 µl. Il ciclo di amplificazione seguito prevedeva: denaturazione iniziale per 5 min a 95° C, seguita da 20 cicli con denaturazione per 45 sec. a 94° C, annealing per 1 min a 48° C, ed estensione per 1 min a 72° C.

Per la seconda amplificazione sono stati utilizzati i seguenti *primer*: *nifH* 11 (5'-GAYCCNAARGCNGACTC) e *nifH* 22 (5'-ADWGCCATCATYTCRCC) (Yeager *et al.*, 2005). Questa reazione è stata eseguita con 32 cicli di amplificazione con una temperatura di annealing di 55° C utilizzando lo stesso tipo di miscela di reazione della prima amplificazione e 10 µl di prodotto della prima amplificazione. Per l'analisi dei T-RFLP è stato utilizzato il *primer nifH*11 marcato. Anche per il frammento *amo* è stata utilizzata una NESTED-PCR..

La prima amplificazione per il frammento *amo* ha previsto l'utilizzo dei *primer amoA* 2F (5'- AARGCGGCSAAGATGCCGCC) e *amoA* 5R (5'- TTATTTGATCCCCTC)

(Webster *et al.*, 2002). Per la reazione sono stati utilizzati: 5 µl di campione di DNA (10 ng/µl), 7 pmol di ciascun *primer*, 1,5 mM MgCl₂ (Life Technologies), 200 µM di ogni dNTP (Life Technologies), Buffer 1X (Life Technologies). e 1,5 U Platinum® Taq DNA polimerasi (Life Technologies) in un volume finale di 30 µl. Il ciclo di amplificazione prevedeva: una denaturazione iniziale per 90 sec a 95° C, seguita da: 5 cicli con denaturazione per 1 min a 95° C, annealing per 1 min a 55° C, un'estensione per 2 min a 72° C; 5 cicli con denaturazione per 1 min a 95° C, annealing per 1 min a 50° C, e un'estensione per 2 min a 72° C; 20 cicli di denaturazione per 1 min a 95° C, annealing per 1 min a 45° C, e un'estensione per 2 min a 72° C.

Nella seconda amplificazione sono stati impiegati i *primer amoA 1F* (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT) and *amoA 2R* (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC) (Rotthauwe *et al.*, 1997). La seconda reazione è stata eseguita utilizzando 2 µl del prodotto di amplificazione della prima reazione, 20 pmol di ciascun primer, 1,5 mM MgCl₂ (Life Technologies), 200 µM di ogni dNTP (Life Technologies), Buffer 1X (Life Technologies) e 1,5 U di Platinum® Taq DNA polimerasi (Life Technologies) in un volume finale di 30 µl. Questa seconda reazione è stata eseguita in 40 cicli di PCR con una temperatura di annealing di 60° C. Per l'analisi dei T-RFLP è stato utilizzato il primer *amoA-1F* marcato.

Tutte le amplificazioni sono state eseguite con una Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700.

3.2.1.5 Analisi T-RFLP.

Dopo conferma del successo delle reazioni di PCR visualizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio, il prodotto di PCR è stato purificato e sottoposto a restrizione enzimatica mediante endonucleasi. Per la purificazione è stato seguito il protocollo del kit QIA quick PCR Purification (250) (Qiagen). Il prodotto di PCR *nifH* è stato digerito con 3 µl di Buffer 10X T, 3 µl di BSA e 1 µl dell'enzima *AfaI* (Life Technologies, USA) in un volume finale di 30 µl. Al prodotto di PCR *amo* invece sono stati aggiunti 2 µl di Buffer 10X K, 1 µl di enzima *AvaI* (Life Technologies, USA) e 3 µl di H₂O bidistillata, per un volume finale di 20 µl. Entrambe le reazioni sono state eseguite a 37° C per un'ora in un bagnetto ad acqua.

Due microlitri dei prodotti di PCR purificati e tagliati con gli enzimi di restrizione sono stati aggiunti a 7 µl di formammide deionizzata e ad 1 µl ROX standard 1000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e sono stati denaturati a 95° C per 5 min. I campioni sono stati caricati su un ABI 3500 Genetic Analyzer per l'analisi della dimensione dei T- RF mediante elettroforesi capillare basata sulla fluorescenza (Applied Biosystems). La dimensione dei frammenti di restrizione è stato determinato con il Software GeneMapper® (versione 4.1) (Life Technologies, USA). Le analogie tra profili sono state calcolate a partire dai dati tabulati esportati dal GeneMapper® in T-Align (Smith *et al.*, 2005). Un valore di confidenza di 1 è stato utilizzato per la categorizzazione dei picchi dei T-RF. I frammenti sono stati allineati con la media mobile. Successivamente è stato generato un file per vedere, la presenza o l'assenza di un T-RF, la sua dimensione media e l'intensità di fluorescenza percentuale di fluorescenza totale in ciascun profilo. I frammenti di restrizione nei profili sono stati considerati lo stesso frammento, se variavano di circa da 0,5 rmu. La successiva analisi dei frammenti è stata eseguita tramite Sequenziatore (ABI 3500) e la loro dimensione è stata determinata mediante il Software GeneMapper® (versione 4.1).

Per determinare le specie dei batteri *nitrificanti* è stato necessario fare un confronto tra la dimensione del frammento ottenuto con le sequenze presenti in letteratura (Yeaer *et al.*, 2004). Gli Accession number dei campioni disponibili in letteratura sono stati ricercati in GenBank al fine di trovarne le sequenze. Successivamente mediante l'"allineamento di sequenze ClustalW" - strumento di MEGA software 6 - è stato determinato il rapporto di somiglianza con i nostri campioni. Siti variabili e informativi sono stati trovati utilizzando il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3.2.1.6 Clonaggio e analisi di sequenze.

Il prodotto di PCR ottenuto da un campione di suolo dell'area controllo è stato clonato nel vettore pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, CA, USA) utilizzando il kit TOPO TA Cloning (Life Technologies, USA) secondo le istruzioni del produttore. Lo screening di colonie bianche ricombinanti è stato effettuato mediante PCR.

Il DNA plasmidico da tutte (58) le colonie bianche ottenute è stato estratto utilizzando il QIAprep Spin Kit Miniprep (Qiagen, Germania) secondo le specifiche del produttore, e amplificato con *primer* M13 F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13 R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Le amplificazioni sono state eseguite in un volume di 20 µl contenente Buffer 1X (Life Technologies), MgCl₂ 1,5 mM (Life Technologies), 250 mM di ciascun trifosfato deossinucleoside (Life Technologies, USA), 0.5 pmol di ciascun *primer*, 2 µl di DNA totale (20 ng / ml), e 1 U di Taq DNA polimerasi Platinum® (Life Technologies). Dopo 5 min a 92 ° C, 30 cicli di PCR (30 sec a 90° C, 1 min a 50° C e 1 min a 72° C) sono state identificati i cloni, con inserto della dimensione attesa, tramite elettroforesi su gel di agarosio.

Il sequenziamento dei frammenti clonati è stato eseguito in entrambe le direzioni tramite amplificazioni indipendenti utilizzando il metodo di Sanger e collaboratori (1977), il kit *Sequenase* (USB) ed i *primer* universali M13. La sequenza è stata determinata utilizzando un ABI 31500 Genetic Analyzer.

Le sequenze di riferimento sono state reperite in GenBank mediante BLASTN del programma BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Per allineare le sequenze ottenute, con quelle di riferimento reperite nel *database*, è stato utilizzato il programma Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del pacchetto MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2010). L'allineamento è stato controllato manualmente e alla fine è stato possibile definire una banca dati per l'analisi di sequenza e per la costruzione delle mappe di restrizione attraverso un'analisi di bioinformatica (Allegati 4 e 5). Questo processo, nel dettaglio, ha previsto 5 step:

- (i) La ricerca della sequenza aminoacidica del gene *nifH*;
- (ii) Allineamento aminoacidico del Nucleotide-binding (chemical binding site);
- (iii) Allineamento aminoacidico di tutte le tutte le sequenze depositate in NBCI e EMBL corrispondenti al frammento amplificato *via* PCR per un totale di 5000 sequenze allineate;
- (iv) Allineamento nucleotidico di tutte le sequenze depositate in NBCI e EMBL corrispondenti al frammento amplificato *via* PCR per un totale di 5000 sequenze allineate;
- (v) Costruzione della mappa di restrizione del frammento di 360 bp.

3.2.1.7 Analisi statistiche.

Prima dell'analisi statistica dei dati è stato effettuato il controllo della normalità (test Kolmogorov - Smirnov) e dell'omogeneità della varianza (test Levene). I dati della densità apparente e della porosità non presentavano una distribuzione normale e quindi, dopo aver applicato il test di Box-Cox, è stata effettuata la normalizzazione applicando una trasformazione con un esponente di "2,8". I valori di resistenza al taglio e di resistenza a penetrazione del suolo, non hanno richiesto una normalizzazione. I dati sono stati sottoposti ad ANOVA a due vie e successivamente per l'individuazione delle differenze tra i gruppi è stato applicato il test post-hoc HSD di Tukey. Tutte le analisi sono state eseguite con il software STATISTICA versione 7 [Statsoft(Europe) GmbH, Hamburg, Germany].

L'analisi di spazializzazione della struttura delle comunità microbiche è stata eseguita con il metodo Bayesian Monte Carlo Markov Chains implementato nel pacchetto Geneland versione 3.0 (Guillot *et al.*, 2009) in linguaggio R come descritto da Guillot e collaboratori (2005a, b; 2008).

Il Geneland inferisce la struttura spaziale e genetica di una popolazione:

- i) determina il numero di suddivisioni (cluster genetici o sottopopolazioni), e assegna gli individui georeferenziati ad una suddivisione;
- ii) rilascia un *outfile* grafico della distribuzione spaziale delle suddivisioni.

Sono state eseguite 10 Monte Carlo Markov Chains indipendenti con le seguenti impostazioni: 1.000.000 iterazioni con 100 intervalli e un periodo di 250.000, con il modello *correlate* per le frequenze alleliche. Il numero massimo di suddivisioni è stato impostato a 20. Una mappa di probabilità a posteriori è stata ottenuta con le funzioni *post-ProcessChain* e *PostTessellation* e con una risoluzione di 1 m.

3.2.1.8 Analisi degli indici di biodiversità.

Sempre per andare a descrivere la diversità ecologica delle comunità batteriche, sono stati calcolati anche gli indici di diversità che tengono conto anche delle abbondanze relative. Quindi a partire dagli *outfile* sono stati calcolati gli indici di biodiversità di Shannon (H') (Shannon, 1948) e Evenness o equipartizione (J') (Pielou, 1966). Nel primo caso si tratta di un indice di diversità che può variare tra 0 e ∞ . A causa della presenza del

logaritmo, dà più peso, rispetto all'indice di Simpson, alle specie rare. La formula è la seguente:

$$H' = - \sum_{j=1}^s p_j \log p_j$$

dove con p_j si indica la proporzione della j -esima specie ($\sum p_j = 1$) ed è dato dal rapporto tra N_j (numero di organismi nel campione che appartengono alla specie j) e N (organismi che sono stati classificati in S categorie). È stato poi calcolato anche l'indice Eveness o di equipartizione (J'), con il quale è possibile sapere quanto una comunità, a prescindere dal numero di specie che contiene, si avvicina al caso ideale della perfetta equipartizione ($H = L(S)$) degli individui tra le specie. Con questo indice si misura il rapporto tra la diversità osservata e quella massima possibile e la formula è la seguente:

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}}$$

dove H' è il numero derivato dal indice di diversità di Shannon e H'_{max} è il valore massimo H' , pari a:

$$H'_{max} = - \sum_{i=1}^s \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} = \ln S$$

Il valore di J' è compreso tra 0, situazione in cui le comunità sono dominate da poche specie, e 1 quando le abbondanze tra le specie si equivalgono. S è il numero totale di specie.

La diversità in specie, di solito misurata mediante l'indice di Shannon, è correlata positivamente con l'Eveness, in accordo a una relazione curvilinea (Rossi e Giavelli, 1983).

3.2.2 Risultati.

3.2.2.1. Parametri fisici del suolo.

I valori dei parametri fisici calcolati per ogni trattamento e replica sono riportati in Tabella 2. La resistenza al taglio e alla penetrazione non hanno evidenziato differenze significative tra i trattamenti, anche se nelle aree tagliate nel 2006 si sono rilevati valori di resistenza al taglio più bassi e valori di resistenza alla penetrazione più alti. I valori registrati per questi parametri fisici nel controllo e nelle aree tagliate nel 2011 sono molto vicini tra loro. La densità apparente nelle aree utilizzate nel 2011, quindi subito dopo l'intervento, è significativamente superiore rispetto al controllo e alle aree utilizzate nel 2006. Di conseguenza la porosità è significativamente più bassa nelle aree utilizzate nel 2011 rispetto alle aree utilizzate nel 2006 e al controllo.

Al momento del campionamento la temperatura non presentava differenze statisticamente significative né tra trattamenti (2011 e 2006) né tra trattamenti e controllo. I valori comunque di quest'ultimo apparivano inferiori rispetto alle aree trattate. Anche per l'umidità non si sono riscontrate differenze significative ma un aspetto importante da segnalare è che nelle aree utilizzate, soprattutto subito dopo il passaggio dei mezzi (2011) i valori erano superiori al controllo.

Una differenza significativa è stata osservata anche per i valori di pH, che hanno mostrato un valore più basso nel 2006 (Tabella 3).

Tabella 2: Valori medi (\pm dev. standard) dei parametri fisici del suolo calcolati per trattamenti e repliche. Le lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i gruppi, Test HSD di Tukey.

Trattamento	Repliche	Resistenza al taglio		Resistenza alla penetrazione		Densità apparente		Porosità	
		(kPa)	(kPa)	(MPa)	(MPa)	(g cm ⁻³)	(g cm ⁻³)	(%)	(%)
2006	1	28,73 (\pm 5,63)	29,4 (\pm 4,91)	0,33 (\pm 0,06)	0,35 (\pm 0,05)	1,04 (\pm 0,92)a	1,02 (\pm 0,29) a	0,61 (\pm 0,35)a	0,62 (\pm 0,11) a
	2	30,07 (\pm 4,06)		0,38 (\pm 0,03)		0,99 (\pm 0,54)a		0,63 (\pm 0,20)a	
2011	1	42,00 (\pm 13,37)	37,1 (\pm 14,04)	0,11 (\pm 0,05)	0,14 (\pm 0,07)	1,63 (\pm 0,65)b	1,62 (\pm 0,17) b	0,38 (\pm 0,25)b	0,39 (\pm 0,07) b
	2	32,13 (\pm 13,12)		0,15 (\pm 0,10)		1,62 (\pm 0,54)b		0,39 (\pm 0,21)b	
Controllo		37,53 (\pm 10,36)	37,5 (\pm 10,36)	0,13 (\pm 0,06)	0,13 (\pm 0,06)	1,06 (\pm 0,18) a	1,06 (\pm 0,18)a	0,60 (0,55)a	0,52 (\pm 0,55)a
p-level		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Tabella 3: Valori medi (\pm dev. standard) del pH determinato su campioni di terreno e di temperatura del suolo e umidità registrati durante il campionamento. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i gruppi, Test HSD di Tukey.

Trattamento	Temperatura	Umidità	pH
	°C	%	
2006	23,63 (\pm 1,2)	6,14 (\pm 6,81)	4,09 (\pm 0,46)a
2011	25,53 (\pm 1,59)	12,71 (\pm 3,37)	4,37 (\pm 0,44)b
Controllo	22,08 (\pm 1,92)	4,72 (\pm 2,41)	4,46 (\pm 0,37)c

3.2.2.2 Profili T-RFLP e analisi di sequenze.

In Tabella 4 sono riportate le mappe di restrizione del frammento *nifH* e del frammento *amo* ottenute dopo restrizione. Possiamo notare una variazione nelle comunità di batteri azotofissatori in composizione in specie a seguito dell'intervento di utilizzazione forestale. Il confronto tra i frammenti *nifH*, riscontrati nei diversi trattamenti e nel controllo, ha mostrato che:

- (i) tre specie azotofissatrici che non sono state rilevate nell'area controllo, il *Bradyrhizobium elkanii*, *Methylococcus capsulatus* e *Idonella spp*, sono presenti appena subito dopo il taglio (2011);
- (ii) quattro specie presenti nel controllo non sono presenti nelle aree utilizzate (2006 e 2011).

Cinque anni dopo il taglio (2006) si registra la presenza di una nuova specie, il *Beijerinckia derxii*. Il confronto tra i geni *amoA* non mostra invece alcuna differenza tra le aree trattate (2011 e 2006).

I batteri nitrificanti, identificati mediante il frammento *amo*, sembrano essere più ubiquitari, non si riscontrano specie specifiche dell'area controllo o delle/tra le aree trattate (2011 e 2006).

Tabella 4: Mappe di restrizione in bp (paia di basi) dei frammenti *nifH* e amo digeriti rispettivamente con gli enzimi di restrizione *AfaI* e *AvaI*

Frammenti	N° Specie	Prodotto di PCR bp	Mappa di restrizione bp	Specie	Trattamento	Campioni								
<i>nifH</i>	1	360	360	Uncultured bacterium clone U14b-59 (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6	C1/7	C1/9	C2/4	C2/5	C2/9	C 3/4	C3/9	C3/10
					2011	2/8	2/10	2/25	3/7	3/16				
					2006	4/11	4/14	5/18	5/24					
	2	357	40(6) + 28(4) + 5	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6	C1/7	C1/9	C2/5	C2/9	C 3/4	C3/10		
					2011	2/8	2/10	2/25	3/12					
					2006	4/6	5/2	5/24						
	3	357	28(6) + 31(6) + 3	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6	C2/4	C2/9	C 3/4	C3/9	C3/10			
					2011	2/8	2/10	2/25	3/7	3/12				
					2006	4/6	4/9	5/2	5/24					
	4	357	354 + 3	<i>Idonella</i> spp. <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Beijerinckia deroxii</i> <i>Paenibacillus</i> spp.	2011	2/10	3/7							
					2006	4/10	5/2							
	5	357	15 + 28(3) + 129(2)	<i>Idonella</i> spp. <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Beijerinckia deroxii</i>	2006	4/14								
	6	360	28(8) + 34(4)	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	2011	2/10	2/25	3/7						
					2006	4/10	4/14	5/18						

7	360	28(5) + 110(2)	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	2006	2/10 2/25
8	357	126(2) + 28(3) + 21	<i>Idonella</i> spp. <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Beijerinckia dextrii</i>	controllo	C1/7 C2/5
				2011	3/7
9	357	28(12) + 21	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6 C1/9 C2/4
10	360	136 + 168 + 56	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6 C1/9 C2/4 C3/9 C3/10
11	357	228 + 79+44	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/9 C2/4
12	363	182 + 83+ 49(2)	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)	controllo	C1/6 C3/9 C3/10

Frammenti	N° Specie	Prodotto di PCR bp	Mappa di restrizione bp	Specie	Trattamento	Campioni
<i>amo</i>	1	75	40 + 30 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.	controllo	C1/7
					2011	2/10 3/7 3/12 3/16
					2006	4/14 5/18 5/24
	2	75	38 + 32 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.	controllo	C1/6 C1/7 C1/9 C2/4 C2/5 C2/9 C 3/4 C3/9
					2011	2/8 2/10 2/25 3/7 3/12 3/16
					2006	4/6 4/10 4/14 5/2 5/18 5/24
	3	75	38 + 34 + 3	<i>Nitrosolobus</i> spp.	controllo	C1/7 C1/9 C2/4 C2/5 C 3/4
					2011	2/8 2/10 2/25 3/12
					2006	5/2 5/18 5/24
	4	75	21(2) + 28 + 5	<i>Methylmicrobium</i> spp.	controllo	C1/6 C1/7 C1/9 C2/4 C2/5 C2/9
					2011	2/8 2/10 2/25 3/7 3/7 3/16
					2006	5/6 4/10 4/14 5/18 5/24
	5	75	40 + 28 + 7	<i>Nitrosospira</i> spp.	controllo	C1/7 C1/9 C2/4 C2/5 C 3/4
					2011	2/8 2/10 2/25 3/7 3/12 3/16
					2006	4/9 5/2 5/18 5/24
	6	75	40 + 21 + 14	<i>Nitrosococcus</i> spp.	controllo	C1/6 C1/7 C1/9 C2/5 C3/9 C3/10
					2011	2/10 2/25 3/12
					2006	4/10 4/14 5/18 5/24
	7	75	42 + 28 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.	controllo	C2/5
					2011	2/10 2/25 3/12
					2006	4/10 4/14 5/18 5/24
	8	75	32 + 40 + 3	<i>Nitrosolobus</i> spp.	controllo	C1/6 C1/9 C2/4 C 3/4 C3/9 C3/10
					2011	2/8 3/7 3/12 3/16
					2006	5/2

3.2.2.3 Analisi di spazializzazione della struttura delle comunità microbiche di azotofissatori e nitrificanti.

L'analisi di spazializzazione della struttura genetica è stata effettuata per entrambe la comunità microbiche (azotofissatori e nitrificanti). La mappa ottenuta, come descritto nel paragrafo 3.2.1.7., della comunità di azotofissatori ha evidenziato che la comunità rilevata nell'area di studio è suddivisa in 2 cluster (genetici) (Figura 1a). In figura 2 (*outfile grafico*) è rappresentata su mappa la distribuzione spaziale dei 2 cluster indicati rispettivamente con i numeri 1 (in verde la sua distribuzione) e 2 (in bianco la sua distribuzione). Le mappe di probabilità a posteriori (la statistica utilizzata in Geneland è di tipo Bayesiano) in figura 2 b, per il cluster 1, e in figura 2 c, per il cluster 2 riportano la probabilità a posteriori di assegnazione degli individui (specie batteriche) georeferenziati ad una suddivisione.

Dalle mappe di probabilità a posteriori appare evidente che i cluster sono completamente isolati. In altre parole le specie azotofissatrici che costituiscono il cluster 1, la cui distribuzione comprende esclusivamente i punti del sito di controllo, sono esclusive e non si ripresentano all'interno delle aree interessate dal taglio (2006 e 2011).

Inoltre, possiamo aggiungere che le specie azotofissatrici che compongono il cluster 2 sono condivise fra tutte le aree interessate dal taglio. Anche nel caso della comunità di nitrificanti possiamo riconoscere 2 cluster, ma questi non appaiono spazialmente isolati (Figura 3). In particolare al cluster 1 (in verde) appartengono specie batteriche sia presenti nel controllo che nell'area interessate dal taglio.

Figura 2. *Analisi della struttura di spazializzazione della diversità genetica per la comunità di azotofissatori (I punti e/o cerchi indicano la posizione del punto di campionamento).*

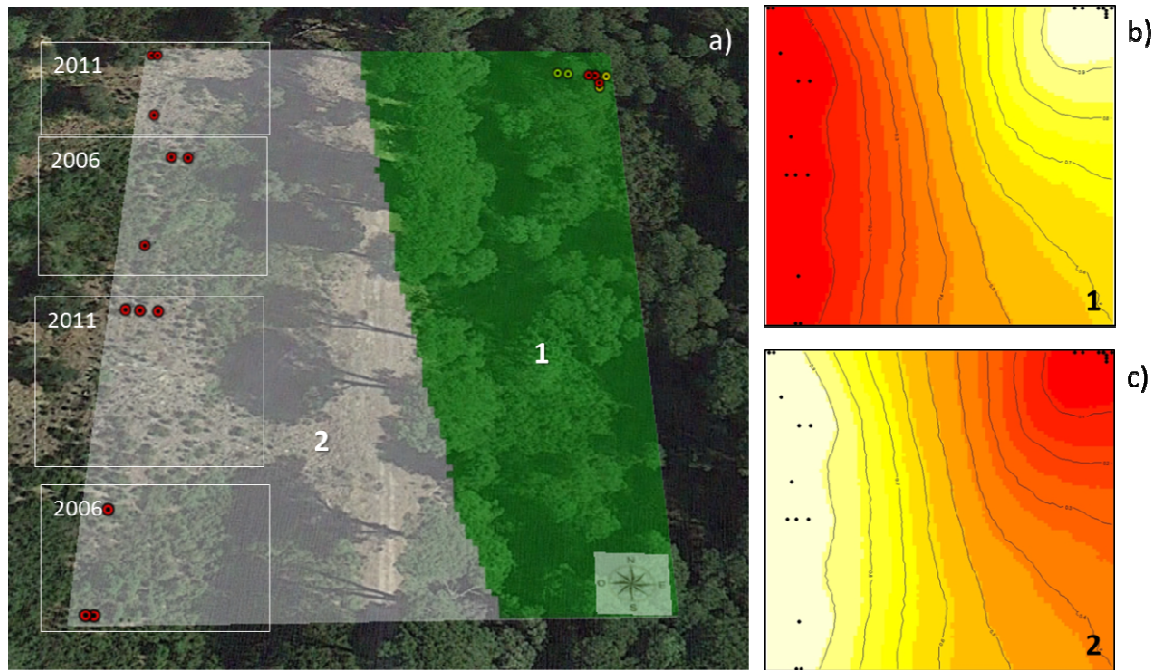
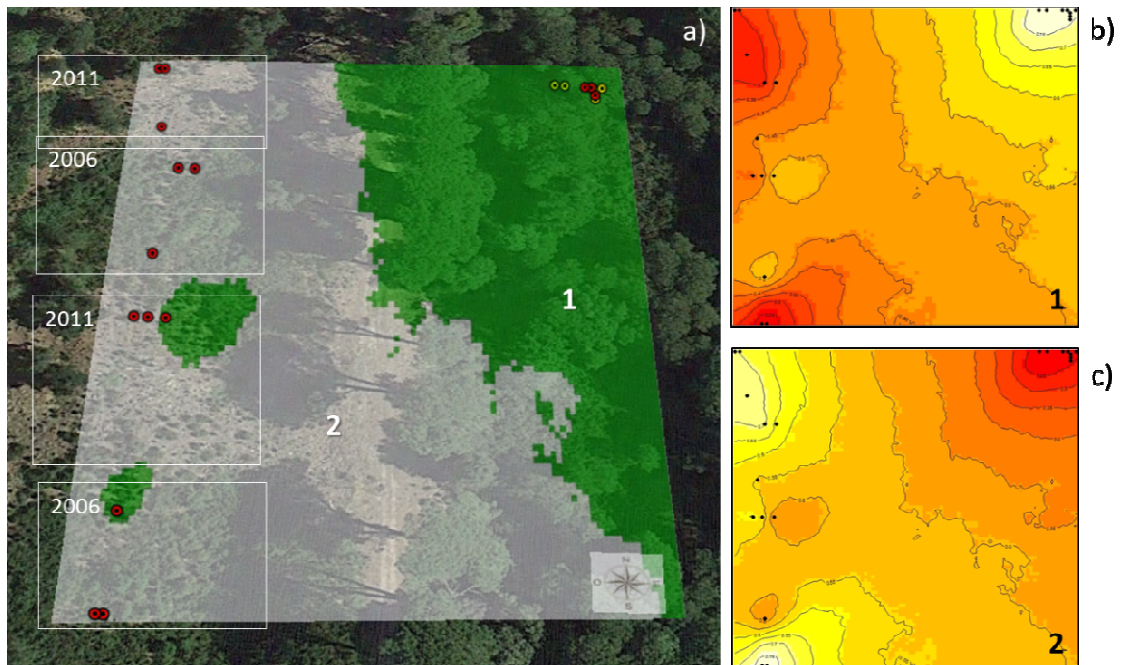


Figura 3. *Analisi della struttura di spazializzazione della diversità genetica per la comunità di nitrificanti (I punti e/o cerchi indicano la posizione del punto di campionamento).*



3.2.2.4 Indici di biodiversità.

L'analisi degli indici di biodiversità calcolata considerando le specie presenti, indipendentemente dal trattamento, sia per la comunità di azotofissatori che per la comunità di nitrificanti, ha evidenziato che: (i) la comunità di azotofissatori presenta una più alta ricchezza di specie e di abbondanza relativa rispetto alla comunità di nitrificanti (indice di Shannon rispettivamente 2,23 e 2,06); (ii) l'indice di uniformità è risultato più alto per la comunità di nitrificanti (indice di uniformità rispettivamente 0,99 e 0,90). Analizzando le differenze tra i trattamenti abbiamo trovato che (Tabella 5): la ricchezza e l'abbondanza relativa di specie, come suggerito dall'indice di Shannon, è maggiore nell'area controllo e minore nell'area tagliata nel 2006, per entrambe le comunità microbiche. L'equiripartizione dell'abbondanza relativa delle specie, come suggerito dall'indice di uniformità, è più alta nel 2006 e più bassa nel controllo per la comunità di azotofissatori; situazione opposta per la comunità di nitrificanti.

Tabella 5: Valori degli indici di biodiversità di Shannon (H') e uniformità (J') per la comunità di azotofissatori e per la comunità di nitrificanti, divisi in base al trattamento. " H' max" indica la possibile diversità max

Trattamento	comunità azotofissatori			comunità nitrificanti		
	H'	H' max	J'	H'	H' max	J'
2006	1,43	2,48	0,58	1,82	2,08	0,87
2011	1,54	2,48	0,62	2,1	2,08	1
Controllo	1,67	2,48	0,67	2,14	2,08	1,03

3.2.3 Discussione.

I risultati hanno mostrato che subito dopo l'intervento (2011), l'impatto al suolo, causato dal passaggio dei mezzi, ha influenzato in modo significativo alcuni parametri fisici del suolo ovvero la densità apparente e la porosità. Al contrario, la resistenza al taglio e alla penetrazione non hanno mostrato differenze statisticamente significative. L'aumento della densità apparente, post-intervento, rilevato in questo lavoro, è stata maggiore rispetto ad altri valori trovati in letteratura per suoli sabbiosi (Magagnotti *et al.*, 2012; Williamson e Neilsen, 2000), tendenzialmente resistenti alla compattazione (Wästerlund, 1985). Questa differenza nei risultati, soprattutto prendendo in considerazione il lavoro di Magagnotti e collaboratori (2012) il quale analizza gli effetti del compattamento (prendendo in considerazione le nostre stesse profondità di suolo) in un cantiere nella stessa zona, e quindi nello stesso tipo di suolo, con gli stessi mezzi forestali, potrebbe essere dovuto sia ai passaggi ripetuti di macchinari molto pesanti utilizzati nelle operazioni di raccolta sia al fatto che nel caso di Magagnotti e collaboratori (2012) i mezzi transitavano su piste permanenti già disegnate in precedenza.

Cinque anni dopo l'intervento (2006) i parametri fisici del suolo mostrano valori simili al controllo (diminuisce densità apparente e aumenta la porosità) suggerendo un buon recupero dei valori fisici. Anche se nel nostro lavoro abbiamo controllato solo le variazioni di porosità totale, diversi autori hanno evidenziato che l'alterazione della porosità interessa principalmente i macropori e quindi il rapporto tra macro e micro-pori (es. Ampoorter *et al.*, 2007; Kutřlek *et al.*, 2006). Una diminuzione della porosità del suolo, in particolare dei macropori ($> 8 \mu\text{m}$) che hanno una maggiore conducibilità all'aria

(Huang et al., 1996) è riconosciuta essere strettamente correlata con le proprietà funzionali del suolo (Young e Ritz, 2000; Frey *et al.*, 2009).

La diminuzione della porosità, e quindi una condizione di suolo compattato, favorendo la ritenzione dell'acqua, tende ad aumentare il tenore di umidità nel suolo. Come per altri lavori trovati in letteratura (McNabb *et al.*, 2001; McDonald e Seixas, 1997; Han *et al.*, 2006) anche questo lavoro conferma questo concetto. Infatti, soprattutto dopo il trattamento (2011) i valori di umidità sono aumentati quasi del 170%.

Le conseguenze di una diminuzione dei macropori sono inoltre rilevanti per il trasferimento dei gas (Currie, 1984) e possono portare ad un cambiamento delle comunità microbiche del suolo, a favore dei microrganismi che tollerano le condizioni anossiche (Ballard, 2000; Schnurr-Putz *et al.*, 2006). Inoltre è molto probabile che anche la continuità dei pori sia stata fortemente influenzata negativamente dal traffico dei mezzi al suolo.

Lavori specifici sull'effetto della compattazione sugli aspetti microbici sono ancora limitati (Hartman *et al.*, 2012; Hartman *et al.*, 2014). I nostri risultati, relativi ai cambiamenti sia della densità apparente che della porosità, hanno mostrato una chiara variazione nel suolo dopo il passaggio dei mezzi.

In particolare la comunità di azotofissatori, sensibili all'ossigeno, presentano una netta differenza in specie nelle aree interessate dal taglio e quindi dal passaggio delle macchine, rispetto all'area controllo. Questo è messo particolarmente in evidenza dall'analisi di spazializzazione della struttura genetica della comunità di nitrificanti da cui appare evidente la separazione e l'isolamento dei due cluster riconoscibili all'interno della comunità di azotofissatori. Per la comunità di nitrificanti appare, invece, evidente che alcune specie sono condivise tra l'area di controllo e le aree interessate dal taglio. Comunque, dobbiamo altresì notare che le specie che costituiscono il cluster 2 sono specifiche delle sole aree interessate dal taglio e condivise tra i due tempi di esecuzione del taglio stesso (2006 e 2011). Dopo il passaggio di macchine pesanti si nota la presenza di metanogeni azotofissatori, riducendo così la capacità di uptake del metano a livello di suolo (Frey *et al.*, 2011). Le variazioni delle comunità microbiche sono molto probabilmente correlate alle condizioni aerobiche del suolo. Hartmann e collaboratori (2014) hanno dimostrato che i batteri capaci di fare la respirazione anaerobica, tra cui riduttori di solfato, zolfo e metalli (Proteobatteri e Firmicutes) sono significativamente associati a suoli compattati, come si è riscontrato in questo lavoro.

La variazione delle comunità microbiche in relazione alla stagionalità e quindi alla disponibilità di acqua è stata dimostrata negli ultimi anni (Rogers e Tate, 2001; Boerner *et al.*, 2005). Questo però non era un obiettivo del nostro lavoro, dove invece volevamo andare a definire gli effetti del taglio e della compattazione sui cambiamenti delle comunità microbiche. Per questo motivo sono stati messi a confronto i campioni di terreno raccolti nella stessa stagione sia per le aree interessate dal taglio che per l'area controllo. A distanza di cinque anni dal passaggio dei mezzi non si ripresentano le condizioni sufficienti per tornare alla composizione della comunità microbica originaria; questo porta a sottolineare l'effetto di lunga durata del disturbo che si crea al suolo. Il tempo necessario per il recupero può essere influenzato dal sistema di raccolta che nel nostro caso comprendeva tutta la biomassa (ramaglia e cimali inclusi). In effetti uno dei fattori che influiscono sulla funzionalità del suolo è la rimozione della materia organica. Hartmann e collaboratori (2012) hanno dimostrato che la rimozione della sostanza organica, relativamente alla variazione della componente microbiologica del suolo post intervento di utilizzazione forestale, può essere più significativa degli effetti del compattamento.

La presenza più elevata di specie azotofissatrici non-simbionti cinque anni dopo l'intervento (2006), e la permanenza delle stesse specie subito dopo l'intervento (2011) può essere determinata dall'assenza delle strato erbaceo ed arboreo, ma la loro presenza può portare, comunque, ad aumento della fertilità del suolo, per l'organizzazione dell'azoto atmosferico da parte di azotofissatori liberi indispensabile per il recupero del suolo e per la crescita della rinnovazione.

Riassumendo, i rilievi e le analisi effettuati in questa area hanno evidenziato questi quattro punti:

- (i) - nessuna variazione significativa per i parametri di resistenza al taglio anche se alcuni valori sono risultati più alti subito dopo l'intervento;
- (ii) - densità apparente e porosità risultano significativamente alterati subito dopo l'intervento ma a distanza di cinque anni, i valori di questi sembrano essere recuperati;
- (iii) -il terreno sabbioso ha mostrato un'elevata resistenza alla compattazione, nonostante il passaggio di veicoli pesanti come il Feller e l'Harvester.

- (iv) le analisi genetiche hanno evidenziato una variazione biologica nel suolo.

3.2.4 Conclusioni.

La compattazione del suolo causata dalla raccolta del legname e più in particolare dal passaggio di mezzi pesanti, può essere una grave minaccia per la salute del suolo, che dovrebbe essere presa in maggior considerazione. Il grado del disturbo dipende da diversi fattori come il tipo di macchina, le condizioni ambientali, le caratteristiche del sito e, in particolare, il tipo di terreno.

Il nostro studio evidenzia la variazione della componente biologica del suolo sia in termini di qualità che di quantità dopo un'utilizzazione forestale gestita con un alto livello di meccanizzazione su suolo sabbioso. Le analisi dei cambiamenti delle comunità microbiche forniscono importanti informazioni sull'impatto al suolo, a livello biologico e rappresentano un utile background per pianificare il ripristino della zona a livello ambientale e produttivo.

Nello specifico, possiamo affermare che, nonostante i suoli sabbiosi siano maggiormente resistenti a fenomeni di compattamento, da questo studio è emerso che alterazioni dei parametri fisici si possono riscontrare in determinate situazioni di forte stress per il suolo (es. passaggio ripetuto di mezzi pesanti). Inoltre è stato messo in evidenza che, anche se alcuni di questi parametri fisici non evidenziano impatti sul suolo apparenti, le alterazioni si possono verificare comunque a livello biologico per effetto del cambiamento sulle caratteristiche dei pori, con aumento della ritenzione idrica (evidenziato anche dai nostri risultati) e con una riduzione degli scambi gassosi. In generale appare quindi importante sottolineare la necessità di non limitarsi ad analizzare i parametri fisici per verificare l'effetto del passaggio dei mezzi meccanici su suoli sabbiosi. Su questi terreni, infatti, per la valutazione degli impatti sarebbe opportuno effettuare anche analisi relative alle variazioni nelle caratteristiche dei pori, alla conducibilità all'aria e all'acqua ed ai cambiamenti delle caratteristiche biologiche.

In futuro potrebbe essere necessario ed interessante valutare le differenze in termini di comunità microbiche nelle diverse stagioni a seguito di interventi di utilizzazione di questo tipo.

Con la stagionalità infatti le comunità microbiche possono variare e le conseguenze di un eventuale impatto al suolo si potrebbero accentuare o ridurre; cosa che richiede un approfondimento di indagine.

3.3 Analisi dell'impatto sul suolo causato dal transito con trattore gommato e con trattore cingolato in un popolamento misto di conifere nell'Appennino toscano.

3.3.1 Introduzione.

A differenza di una vasta letteratura in materia di impatti al suolo relativi ad un alto livello di meccanizzazione (Ares *et al.*, 2005; Eliasson *et al.*, 2005; Ampoorter *et al.*, 2007 e 2012; Horn *et al.*, 2004 e 2007), pochi studi hanno esaminato l'impatto di macchine meno pesanti usate in silvicoltura (Jansson e Wästerlund, 1999; Picchio *et al.*, 2012; Jourgholami *et al.*, 2014) soprattutto in ambiente mediterraneo.

In questo studio abbiamo applicato un approccio integrato per valutare l'impatto al suolo di due diversi sistemi di propulsione dei mezzi da esbosco. Nel dettaglio, gli obiettivi di questo studio sono stati: (i) l'analisi degli effetti del passaggio di un trattore gommato ed uno cingolato sui parametri fisici del suolo (densità apparente, porosità, resistenza al taglio e resistenza alla penetrazione); (ii) la valutazione di una relazione tra il numero di passaggi e la profondità dei solchi prodotti dagli organi di propulsione; (iii) l'analisi molecolare sulla componente microbica del suolo a seguito del passaggio dei mezzi. Tutti questi aspetti sono stati esaminati considerando due livelli di umidità del suolo, per valutare l'importanza di questo fattore sui cambiamenti che si possono verificare al suolo dopo il passaggio dei mezzi. In dettaglio è stata considerata una condizione di suolo più "umida" (24-25%) e una più "asciutta" (11-13%).

3.3.2 Materiali e metodi.

3.3.2.1 Area di studio.

L'area di studio si trova nel complesso forestale di Rincine, nel comune di Londa, a circa 70 km da Firenze, gestito dall'Unione dei Comuni Valdarno Valdisieve. In particolare lo studio è stato condotto in un popolamento misto di abete rosso (*Picea abies* L.), douglasia (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) e abete bianco (*Abies alba* Mill.), di 30 anni, posto a circa 900 m s.l.m. su un terreno a moderata pendenza (5-10 %). Il

popolamento in oggetto doveva essere sottoposto ad un diradamento che prevedeva l'abbattimento delle piante con motosega e l'esbosco delle piante intere sia con un trattore gommato che con un trattore cingolato. Il clima è tipicamente continentale con temperature medie annuali, minime e massime, di 6.8°C e 13.6°C rispettivamente e precipitazioni medie annuali di 1000-1300 mm. Il suolo è classificato come franco argilloso e lo spessore medio della lettiera misurato è di 3.5 cm. Per definire meglio la tessitura di questo suolo è stata calcolata la distribuzione granulometrica del terreno con il metodo del densimetro come descritto da Gee e Bauder (1986). Questo è stato possibile determinando lo spessore medio della lettiera forestale e dopo aver raccolto cinque campioni nei primi 30 cm di suolo minerale, distribuiti omogeneamente in tutta l'area di studio.

Prima dell'inizio dei lavori di diradamento sono state effettuate le prove sperimentali per la valutazione degli effetti degli organi di propulsione sul compattamento e sulla solcatura del suolo. Le prove sono state eseguite prima del taglio per evitare qualsiasi alterazione del suolo durante le fasi di abbattimento delle piante.

Le prove sono state eseguite impiegando:

- un trattore gommato New Holland T 4050 (cilindrata 4500 cm³ e 71 kW) equipaggiato con pneumatici anteriori 320/65-18 e pneumatici posteriori 440/65-24. La pressione di gonfiaggio dei pneumatici era di 140 kPa e di 100 kPa rispettivamente per i pneumatici anteriori e posteriori. Il trattore aveva una massa di 40,6. La pressione di contatto a terra rilevata è stata di 46 kPa per i pneumatici anteriori e 54 kPa per i pneumatici posteriori.
- un trattore cingolato New Holland 88-85 (cilindrata 3908 cm³ e 62.5 kW) con una massa di 46 kN ed una pressione di contatto a terra misurata di 35 kPa.

Per misurare la superficie di contatto (statica) dei pneumatici, su terreno pianeggiante, abbiamo utilizzato una corda stretta intorno alla porzione di pneumatico appoggiata sul terreno e la lunghezza della corda è stata considerata come perimetro dell'area di contatto del cerchio (Neri *et al.*, 2007). Successivamente è stata calcolata la pressione esercitata sul terreno, (pressione di contatto) considerandola uniformemente distribuita su ogni punto delle quattro aree di contatto. Questa pressione è data dal rapporto tra la massa del veicolo e la superficie di contatto.

3.3.2.2 Disegno di campionamento.

Nell'area di studio, sono stati individuate e perimetrate tre aree di 50 x 50 m, con caratteristiche simili. Ogni area è stata poi suddivisa in quattro sotto-aree di 25 x 25 m. All'interno di ogni sotto-area sono state individuate due piste di 25 m di lunghezza, per un totale di 24 piste (3 aree x 4 sotto-aree x 2 piste = 24). In ogni sotto-area una pista è stata percorsa dal trattore gommato e l'altra da quello cingolato per un totale di 12 adibite al passaggio del trattore gommato e 12 al passaggio del trattore cingolato. In sei sotto-aree il transito dei mezzi è avvenuto in condizioni di suolo più umido (24-25 %) e nelle altre sei, in condizioni con minor umidità (11-13%).

Per valutare esclusivamente gli effetti dei diversi organi di propulsione ed evitare gli effetti di altri fattori non controllabili, entrambi i trattori sono transitati sulle piste a scarico, quindi non in fase di strascico di piante o tronchi. Durante e dopo le prove lungo le piste sono state determinate la (i) compattazione del suolo dopo 5 passaggi del trattore (un passaggio = andata + ritorno) e la (ii) profondità del solco lasciata dai mezzi dopo 1, 3 e 5 passaggi.

Per misurare il livello di compattazione del suolo, sono stati raccolti 30 campioni di suolo (5 campioni per ogni pista) prima e dopo il quinto passaggio dei mezzi. Tali campioni sono stati raccolti in maniera uniformemente distribuita prima del passaggio dei mezzi e all'interno dei solchi lasciati dagli organi di propulsione dopo il passaggio. Come per lo studio precedente, i campioni sono stati raccolti tramite dei cilindri metallici (alti 8,5 cm e larghi 5 cm) dopo aver tolto la lettiera superficiale (Allegato 1). Questi campioni sono stati raccolti, il giorno seguente il passaggio dei mezzi, posti in sacchetti di plastica ed in laboratorio sono state eseguite le misure per la determinazione della densità apparente e della porosità.

Come precedentemente eseguito per i rilievi all'interno del Parco di San Rossore è stato dunque necessario calcolare il peso fresco e quello secco (in stufa a 105° per 16 h). I valori del peso secco sono stati successivamente rapportati al volume del cilindro (158.96 cm³) ed in questo modo si ottiene la densità apparente (BD) Per la porosità (P) dei campioni di suolo abbiamo applicato la seguente formula:

$$P = ((\text{densità reale} - \text{densità apparente}) / \text{densità reale}) \times 100$$

dove la densità reale del suolo rappresenta la densità delle particelle misurata con un picnometro (Multipycnometer, Quantachrome) solida; questo valore corrisponde a $2,65 \text{ mg m}^{-3}$.

Sempre al fine di vedere le variazioni pre- e post-intervento in termini di compattamento, sono state misurate le resistenze del suolo al taglio e alla penetrazione con uno scissometro (Sciss-S100; GEONOR 72412) ed un penetrometro (Pen-P100; TONS/FT2), rispettivamente. Anche per questi sono stati determinati 30 valori per ognuno, prima e dopo l'intervento, in prossimità dei campioni raccolti con i cilindri. In campo è stato rilevato anche il valore dell'umidità del suolo, al momento del passaggio dei mezzi, mediante il kit W.E.T Sensor Kit (Delta-T Devices).

Al fine di valutare invece i vari livelli di approfondimento dei solchi nelle zone di passaggio degli organi di propulsione sono stati individuati lungo ogni pista tre "punti barriera", posti a 7,5; 12 e 17 m dall'inizio della pista. Per ognuna di queste barriere è stata posizionata un'asta livellata orizzontalmente e ogni 10 cm è stato misurato il dislivello tra l'asta e il terreno. Tutte le misure sono state effettuate prima del passaggio dei trattori e dopo 1, 3 e 5 passaggi. La differenza tra il dislivello prima e dopo il passaggio dei mezzi ha successivamente permesso di determinare la variazione di livello del suolo. La finalità è stata quella di determinare sia la profondità dei solchi sia avere il profilo del terreno prima e dopo i passaggi dei mezzi.

Per le analisi molecolari, così come per lo studio nella pineta di San Rossore, sono stati utilizzati i campioni di suolo raccolti per l'analisi del compattamento. In questo caso abbiamo confrontato 16 campioni di suolo scelti in maniera casuale tra quelli considerati per il calcolo della densità apparente e della porosità (8 raccolti con suolo umido e 8 con suolo asciutto) relativi alle piste percorse da entrambi i mezzi, per un totale di 32 campioni di suolo "disturbato", con i 30 campioni raccolti prima del passaggio (controllo).

3.3.2.3 Estrazione del DNA da suolo e amplificazioni PCR per i frammenti *nifH* e *amo*.

L'estrazione del DNA da suolo ha seguito lo stesso protocollo usato per le analisi all'interno del Parco Regionale di San Rossore-Migliarino- Massaciuccoli (Porteous *et al.*,

1997 modificato). Anche per questa area, per quanto riguarda le amplificazioni dei frammenti *nifH* e *amo*, è stato applicato un protocollo di NESTED - PCR con *primer* degenerati e sono state utilizzate le stesse miscele di reazione dell'altro studio.

3.3.2.4 Analisi T-RFLP.

Dopo il successo delle amplificazioni di PCR visualizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio, il prodotto di PCR è stato purificato e sottoposto a restrizione enzimatica mediante endonucleasi. Anche per queste analisi il protocollo e gli enzimi utilizzati sono stati quelli dell'area del parco di San Rossore. Attraverso il Sequenziatore (ABI 3500) è stato in seguito possibile eseguire l'analisi dei frammenti e la loro dimensione con il Software GeneMapper® (versione 4.1) basandosi sulla banca dati costruita precedentemente per il primo studio (Allegati 4 e 5).

3.3.2.5 Analisi statistiche.

L'analisi statistica dei dati sono state eseguite con il software STATISTICA versione 7 [Statsoft(Europe) GmbH, Hamburg, Germany]. Per tutti i dati è stato eseguito il controllo della normalità (test di Kolmogorov-Smirnov) e dell'omogeneità della varianza (test di Levene). Successivamente sono state applicate una "one-way" e "two-way" ANOVA e MANOVA analisi e un test post-hoc Tukey HSD per valutare le differenze statistiche tra i gruppi. Il test di Kruskal-Wallis è stato applicato ai dati di densità apparente perché non rispettano l'omogeneità della varianza. Un modello di regressione lineare è stato applicato per determinare il rapporto tra la profondità carreggiata e il numero di passaggi.

3.3.2.6 Analisi degli indici di biodiversità.

Anche per questa area di studio sono stati misurati gli indici di biodiversità di Shannon (H') (Shannon, 1948) e Evenness o equipartizione (J') (Pielou, 1966) applicando le formule come nel paragrafo 3.2.1.8.

La diversità in specie, di solito misurata mediante l'indice di Shannon, risulta essere correlata positivamente con l'Evenness, in accordo a una relazione curvilinea (Rossi e Giavelli, 1983).

3.3.3 Risultati.

3.3.3.1 Parametri fisici del suolo.

La distribuzione granulometrica del suolo è risultata omogenea in tutta l'area di studio; si tratta di un suolo argilloso secondo la classificazione USDA: 13,5 ($\pm 4,2$) – 9,4 ($\pm 3,8$) – 28 ($\pm 3,8$) – 38,9 ($\pm 8,8$) – 10,2 ($\pm 2,1$) come sabbia grossa, sabbia media, sabbia fine, limo e argilla rispettivamente (valori medi e tra parentesi deviazione standard, $n = 5$). Le proprietà fisiche del suolo (densità apparente, porosità, taglio e resistenza alla penetrazione) hanno mostrato differenze statisticamente significative tra le zone di suolo trafficate e il controllo (Tabella 6).

Le stesse proprietà hanno evidenziato differenze significative tra i trattamenti (trattore gommato e cingolato, terreno umido e secco). In particolare, la densità apparente era in condizioni di terreno umido rispetto al terreno asciutto per il trattore gommato, mentre nel caso del trattore cingolato, terreno umido e secco non hanno mostrato alcuna differenza significativa ($p > 0,05\%$). Contrariamente, il trattore cingolato ha mostrato differenza significativa per i parametri di resistenze taglio e penetrazione tra terreni umidi ed asciutti (Tabella 7).

Tabella 6 – Valori medi di densità apparente e porosità (\pm deviazione standard) misurati in ogni trattamento. Le diverse lettere mostrano una differenza statistica significativa tra i vari trattamenti a seguito del test di Tukey ($P < 0,05$, $N = 210$).

Mezzi	Densità apparente (g/cm ³)	Porosità (%)
<i>Controllo</i>	0,72 \pm 0,16 c	73 \pm 6 c
<i>Gommato asciutto</i>	0,91 \pm 0,02 b	65 \pm 6 b
<i>Cingolato asciutto</i>	0,97 \pm 0,08 ab	63 \pm 3 ab
<i>Controllo</i>	0,77 \pm 0,11 c	71 \pm 4 c
<i>Gommato umido</i>	1,02 \pm 0,17 a	62 \pm 7 a
<i>Cingolato umido</i>	0,98 \pm 0,11 ab	63 \pm 4 ab

Tabella 7 – Valori medi di resistenza al taglio e a penetrazione (\pm deviazione standard) misurati in ogni trattamento. Le diverse lettere mostrano una differenza statistica significativa tra i vari trattamenti a seguito del test di Tukey ($p < 0,05$).

Mezzi	Resistenza al taglio (kPa)	Resistenza a penetrazione (MPa)
<i>Controllo</i>	21,51 \pm 2,69 c	0,29 \pm 0,07 c
<i>Gommato asciutto</i>	88,67 \pm 5,60 a	0,42 \pm 0,011 a
<i>Cingolato asciutto</i>	66,87 \pm 4,01 b	0,37 \pm 0,013 b
<i>Controllo</i>	19,12 \pm 4,95 c	0,26 \pm 0,05 c
<i>Gommato umido</i>	96,27 \pm 0,76 a	0,39 \pm 0,012 a
<i>Cingolato umido</i>	80,25 \pm 1,58 a	0,40 \pm 0,007 a

La tabella 8 mostra la variazione percentuale tra trattamenti e controllo per i valori di densità apparente e forze di resistenza del suolo. Per tutti i trattamenti e per le proprietà del suolo, i valori erano più alti nelle aree trafficate rispetto al controllo. In dettaglio, il minor aumento di densità apparente è stato registrato con il trattore gommato su terreno asciutto, mentre l'incremento maggiore si è verificato per il trattore gommato sul terreno bagnato. Le resistenze a taglio e a penetrazione hanno mostrato un aumento minore con l'impiego del trattore cingolato su terreno asciutto, e un aumento maggiore per il trattore gommato sul terreno umido.

Tabella 8 – Risultati dei parametri meccanici del suolo (media, \pm deviazione standard e incremento percentuale rispetto al valore di controllo).

Mezzi	Umidità (%)	Densità apparente (g cm⁻³)	Resistenza al taglio (kPa)	Resistenza a penetrazione (Mpa)
<i>Controllo</i>	11,98	0,75	21,5	0,29
<i>Gommato asciutto</i>	11,58 \pm 0,66	21,3%	312,4%	44,8%
<i>Cingolato asciutto</i>	12,37 \pm 0,60	30,0%	211,0%	27,6%
<i>Controllo</i>	24,47	0,75	19,1	0,26
<i>Gommato umido</i>	24,34 \pm 0,83	36,0%	404,0%	50,0%
<i>Cingolato umido</i>	24,60 \pm 0,75	30,0%	320,2%	53,8%

3.3.3.2 Relazione tra la profondità del solco e il numero di passaggi.

L'analisi degli effetti dei passaggi sulla formazione dei solchi nel terreno ha evidenziato differenze statisticamente significative tra il numero di passaggi (Tabella 9). Dopo il primo passaggio, sia il trattore gommato che il trattore cingolato hanno creato solchi più profondi nel terreno umido rispetto al terreno asciutto, ma non sono state registrate differenze statisticamente significative tra i trattamenti considerando le solite condizioni di umidità.

Dopo il terzo passaggio, i solchi si sono approfonditi ulteriormente ma soltanto la differenza tra il trattore gommato sul terreno umido e il trattore cingolato su terreno asciutto era statisticamente significativa. Dopo tutti e cinque i passaggi, non si è verificata nessuna differenza statisticamente significativa tra i trattamenti, per quanto riguarda la profondità totale dei solchi. L'analisi di regressione applicata per definire gli effetti del numero dei passaggi è risultata statisticamente significativa ($p < 0,01$) solo per le prove del trattore gommato.

Tabella 9 – Risultati della MANOVA ad una via relativa alla variazione della profondità del solco (cm) in base al numero di passaggi di veicoli forestali. Le diverse lettere rappresentano gruppi statisticamente diversi all'interno della singola variabile. HSD test (N=144).

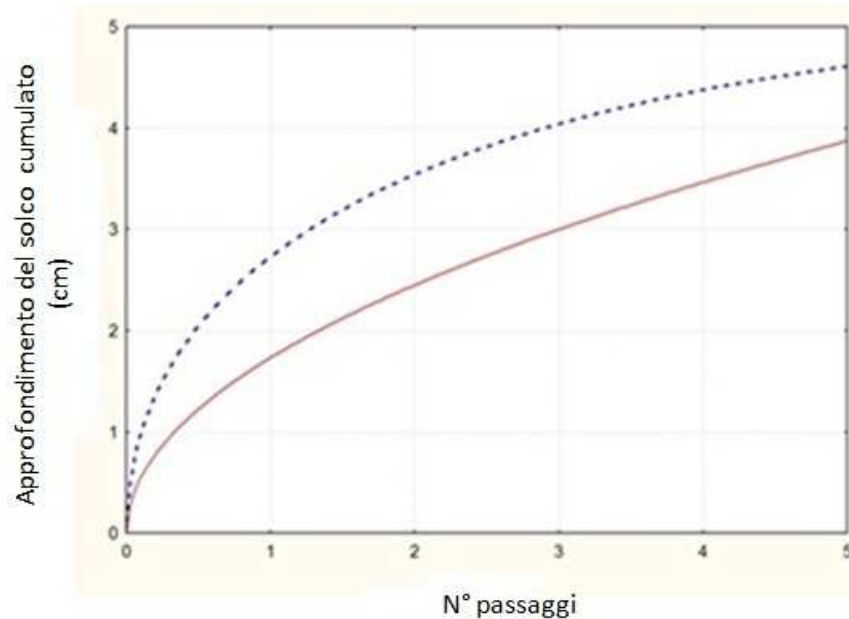
		Test	Valore	F	Effetti	<i>p-value</i>	
Gruppi Dopo 1 passaggio		Wilks	0,8691	22,144	9	0,02082	
Gruppi Dopo 3 passaggi							
Gruppi Dopo 5 passaggi							
Gruppi	N	Average	SD	Incremento medio di profondità rispetto al primo passaggio	SD	Incremento medio di profondità rispetto al terzo passaggio	SD
<i>Gommato asciutto</i>	3						0,4
	6	1,51 b	1,18	0,85 ab	0,63	0,44	7
<i>Cingolato asciutto</i>	3						0,7
	6	1,64 b	2,88	0,53 a	0,3	0,6	2
	3						0,4
<i>Gommato umido</i>	6	2,84 a	1,77	1,10 b	0,82	0,52	3
	3						0,8
<i>Cingolato umido</i>	6	3,41 a	6,32	0,95 ab	0,97	0,56	4
<i>p-level</i>		< 0,05		< 0,01		< 0,05	

I risultati nel dettaglio dell'analisi del test di regressione sono visibili in tabella 10 e in Figura 4.

Tabella 10 – Riepilogo regressione per (i) trattore gommato su terreno umido: $R^2 = 0,507$, R^2 modificato = 0,500 $F(2,141) = 72,598$ e per (ii) trattore gommato su terreno asciutto: $R^2 = 0,478$, R^2 modificato = 0,471 $F(2,141) = 64,692$.

		Beta	Errore standard	B	Errore standard	t(141)	p-level
(i)	N° passaggi	-0.41682	0.209693	-0.54195	0.272641	-1.98776	0.048775
	(N° passaggi) ^{0.5}	1.102428	0.209693	3.272679	0.622495	5.25735	0.000001
		Beta	Errore standard	B	Errore standard	t(141)	p-level
(ii)	(N° passaggi) ^{0.5}	0.941042	0.215737	1.732946	0.397283	4.362	0.000025

Figura 4. Analisi di regressione del trattamento con i gommati. Relazione tra l'approfondimento cumulato del solco in relazione al numero di passaggi. La curva tratteggiata è riferita al gommato all'interno delle piste percorse in condizioni di maggior umidità mentre la curva continua è riferita al gommato all'interno delle piste con minor umidità.



3.3.3.3 Comunità batteriche analizzate dai profili T-RFLP.

In tabella 11 è riportata la somma dei frammenti di restrizione, sia per il frammento *nifH* che per il frammento *amo*. Possiamo notare come i batteri azotofissatori (*nifH*) abbiano chiaramente subito un'alterazione a seguito del passaggio delle due tipologie di trattori ed in entrambe le condizioni di umidità (Allegato 3).

Dopo il passaggio del trattore cingolato, in entrambe le condizioni di umidità, si può evidenziare la comparsa di una specie non presente nel controllo (Specie 8). Anche se questa, dalla dimensione dei frammenti, risulta appartenere ad un batterio non coltivabile, è comunque un risultato che differenzia il passaggio del cingolo dal gommato; infatti dopo il passaggio di quest'ultimo non la ritroviamo.

Per quanto riguarda i batteri ammonio ossidanti la situazione sembra essere più uniforme (Allegato 5) e non sembra presentare differenze così marcate come per gli azotofissatori. Nonostante questo dopo il passaggio dei mezzi le specie *Nitrosolobus* spp.,

e *Nitrosospira* spp., presenti nel controllo, non si ripresentano in nessuno dei trattamenti. Nel caso della pista percorsa dal trattore gommato in condizioni di maggior umidità possiamo annotare la mancanza, rispetto al controllo, della specie *Nitrosococcus* spp.

Tabella 11: Lunghezze (bp) dei frammenti di restrizione per i geni *nifH* e *amoA* digeriti con gli enzimi di restrizione *Afa I* e *Ava I*, rispettivamente.

Frammento	N° Specie	Mappa di restrizione bp	Dimensione frammento Bp	Specie
<i>nifH</i>	1	357	15 + 28(3) + 129(2)	<i>Idonella</i> spp. <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Beijerinckia deroxii</i>
	2	357	40(6) + 28(4) + 5	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)
	3	363	182 + 83+ 49(2)	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)
	4	360	28(8) + 34(4)	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)
	5	357	28(6) + 31(6) + 3	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)
	6	357	228 + 79+44	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)
	7	357	126(2) + 28(3) + 21	<i>Idonella</i> spp. <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Beijerinckia deroxii</i>
	8	357	28(12) + 21	Uncultured bacterium clone (soil of mixed conifer forest)

Frammento	N° Specie	Mappa di restrizione bp	Dimensione frammento bp	Specie
<i>amo</i>	1	75	40 + 30 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.
	2	75	38 + 32 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.
	3	75	38 + 34 + 3	<i>Nitrosolobus</i> spp.
	4	75	42 + 28 + 5	<i>Nitrosospira</i> spp.
	5	75	21(2) + 28	<i>Methylmicrobium</i> spp.
	6	75	38 + 28 + 9	Uncultured bacterium clone
	7	75	40 + 28 + 7	<i>Nitrosospira</i> spp.
	8	75	40 + 21 + 14	<i>Nitrosococcus</i> spp.
	9	75	34 (2) + 7	Uncultured bacterium clone
	10	75	32 + 20 (2) + 3	<i>Nitrosolobus</i> spp.

3.3.3.4 Indici di biodiversità.

L'analisi degli indici di biodiversità calcolata considerando le specie individuate, indipendentemente dalle quattro tipologie di trattamento, sia per i frammenti *nifH* che per i frammenti *amo*, ha evidenziato che: (i) le comunità nitrificanti presentano un'elevata ricchezza di specie (indice di Shannon rispettivamente 2,15 e 1,65 per i frammenti *amo* e *nifH*); (ii) anche l'indice di uniformità è risultato più elevato per i frammenti *amo* (indice di uniformità rispettivamente 0,93 e 0,79 per i geni *amoA* e *nifH*).

Analizzando le differenze tra i trattamenti, in tabella 12 è possibile vedere il confronto, tra il controllo ed i quattro trattamenti, degli indici di biodiversità per entrambe le comunità batteriche.

Tabella 12 – Valori degli indici di biodiversità di Shannon (H') e uniformità (J') per i batteri contenenti geni *nifH* o *amoA*, divisi in base alle quattro tipologie di trattamento. " H' max" indica la possibile diversità max.

Mezzi	condizione di suolo	comunità azotofissatori			comunità nitrificanti		
		H'	H max	J'	H'	H max	J'
Controllo		1,27	2,08	0,61	2,65	3,26	0,81
Cingolo	Asciutto	0,53	2,08	0,25	1,78	2,30	0,72
	Umido	0,69	2,08	0,47	1,24	2,30	0,72
Gommato	Asciutto	0,69	2,08	0,33	1,82	2,30	0,79
	Umido	0,69	2,08	0,33	1,52	2,30	0,66

Per quanto riguarda la variazione della comunità di azotofissatori la diminuzione maggiore, per l'indice di Shannon, si verifica dopo il passaggio del trattore cingolato nelle condizioni di minor umidità. Facendo riferimento all'indice di Eveness o di equipartizione (J') la solita comunità tende a diminuire dopo le quattro tipologie di trattamento, ed anche in questo caso la diminuzione maggiore si verifica nella pista percorsa dal trattore cingolato in condizioni di minor umidità.

L'indice di Shannon riferito alla comunità di nitrificanti mostra una diminuzione maggiore nelle piste percorse in condizioni di maggior umidità ed anche per questa tipologia di batteri, nelle piste percorse dal cingolo sembra esserci una maggiore

diminuzione. Come per gli azotofissatori, l'indice Evenness o di equipartizione (J') diminuisce dopo i vari trattamenti soprattutto dopo il passaggio del trattore gommato in condizione di maggior umidità.

3.3.4 Discussione.

L'analisi delle proprietà fisiche del suolo (densità apparente, porosità, resistenza al taglio e resistenza alla penetrazione) è risultata essere esplicativa nello spiegare l'impatto dei due tipi di mezzi forestali al suolo in diverse condizioni di umidità. I valori di densità apparente e porosità sono cambiati significativamente all'interno delle piste, dove il traffico dei mezzi è stato concentrato (Picchio *et al.*, 2012). Gli aumenti dei valori di densità apparente sono in linea con i valori ritrovati in letteratura (McNabb *et al.*, 2001).

La riduzione della porosità del suolo registrata è risultata essere compresa tra -11%, all'interno delle piste percorse dal gommato in condizione di umidità minore, e il -13%, sempre per le piste del trattore gommato ma con un più alto contenuto di umidità al suolo al momento del passaggio. Queste riduzioni possono incidere negativamente, sulla conducibilità idraulica satura del suolo, limitando la capacità di infiltrazione del suolo (Ballard, 2000), e sulla disponibilità di aria per le radici delle piante (Williamson and Neilsen, 2000). Dalla tabella 10 è inoltre possibile notare come per il trattore gommato il livello di umidità giochi un ruolo significativo a livello di impatti sulla densità apparente e sulla porosità.

Per quanto riguarda il trattore cingolato, la diminuzione della porosità nelle piste percorse dal trattore cingolato è del -11% all'interno delle piste percorse in condizioni di maggior umidità e del -14% in condizioni di minor umidità del suolo. Per quanto riguarda il valore di densità apparente, il passaggio del cingolo in condizioni di umidità maggiore, è risultato essere meno rilevante del gommato misurato in piste con livello di umidità minore (+27% vs +32% rispettivamente). Questi risultati dimostrano che in condizioni di maggior umidità il mezzo gommato sembra essere più impattante del cingolo; situazione opposta invece si verifica in condizioni di umidità minore. In generale però, fra i due tipi di trattore impiegati, quello a cingoli sembra creare meno alterazioni a livello di proprietà fisiche del suolo; molto probabilmente per la bassa pressione di contatto a terra applicata (35 kPa vs 48 kPa del trattore gommato). Questo andamento potrebbe essere spiegato dal fatto che su

terreno asciutto (meno soggetto a compattamento) la minore pressione specifica del cingolo è compensata dall'“effetto vibrazione” caratteristico dell'avanzamento dei mezzi cingolati. Questo effetto, su terreno asciutto, potrebbe essere la causa della maggiore compattazione causata dal cingolato rispetto al gommato. Quando l'umidità del suolo aumenta, il fattore pressione specifica prevale sul fattore “vibrazione” e il gommato torna ad essere maggiormente impattante rispetto al gommato. Queste ipotesi di effetto sul compattamento dei due diversi mezzi dovranno essere verificate con futuri studi dedicati.

I valori di resistenza al taglio del suolo sono aumentati notevolmente dopo il passaggio di entrambi i mezzi forestali, cosa che potrebbe creare dei problemi ad un successivo recupero delle condizioni di suolo iniziali. La stessa proprietà del suolo ha mostrato una differenza significativa tra le piste percorse dal trattore cingolato in condizioni più asciutte e in condizioni di maggior umidità e tra il trattore cingolato in condizioni più asciutte e trattore gommato in condizioni di maggior umidità. Nelle piste percorse con trattore gommato, in condizioni di minor umidità del suolo, i valori che si ottengono sono intermedi alle piste percorse con il trattore gommato e il trattore a cingoli nelle condizioni di maggior umidità. Anche i valori di resistenza alla penetrazione presentano differenze statisticamente significative in condizioni di minor umidità, tra trattore gommato e trattore cingolato. Dopo il passaggio dei mezzi si sono registrati dunque aumenti delle forze di resistenza del suolo, le quali stanno ad indicare un deterioramento del suolo in quanto indice di una ridotta lavorabilità (Hathaway-Jenkins *et al.*, 2010). Pertanto, l'aumento sia della resistenza a taglio che a penetrazione può essere indice del deterioramento sostanziale del suolo e della creazione di condizioni sfavorevoli per la crescita degli alberi, almeno nelle porzioni di suolo vicino alle piste, ovvero al terreno compattato (Donnelly and Shane, 1986; Day and Bassuk, 1994).

In generale, nell'area studiata, l'effetto del traffico del trattore a cingoli sul suolo non sembra essere influenzato dal livello di umidità del terreno, parametro questo che invece influenza significativamente l'impatto da parte del trattore gommato. Il numero dei passaggi, per entrambi i mezzi, ha influenzato gli effetti al suolo, come dimostrato anche da altri autori (Murosky and Hassan, 1991; Sheridan 2003; Eliasson, 2005; Ampoorter *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007).

La tesi ha anche confermato che, per quanto riguarda il trattore gommato, vi è una relazione diretta tra il numero dei passaggi e la profondità dei solchi creati. L'umidità del terreno in questo caso ha un ruolo significativo per diminuire la capacità portante del terreno, il che facilita la formazione dei solchi anche subito dopo un passaggio.

Analizzando adesso i risultati emersi dal calcolo degli indici di biodiversità possiamo notare come la comunità di azotofissatori, per quanto riguarda l'indice di Shannon, ovvero la ricchezza di specie, sia influenzata negativamente dal passaggio del trattore cingolato soprattutto in condizioni di minor umidità. Questo concetto si traduce con una diminuzione relativa all'indice del 58% nelle piste del "cingolo asciutto" e di circa il 45 % nelle piste del "cingolo umido" e del gommato (asciutto e umido) (tabella 12). Per quanto riguarda invece la comunità dei nitrificanti, lo stesso indice mostra una diminuzione maggiore dopo il passaggio del cingolo nelle condizioni di maggior umidità (-53%). La diminuzione percentuale di questa tipologia di comunità batteriche è stata inoltre di circa il 33% per il "cingolo asciutto" e di circa il 53% per il "cingolo umido"; per il "gommato asciutto" invece abbiamo una riduzione di circa il 31% ed infine per il "gommato umido" di circa 43% (tabella 12).

Passando adesso all'indice Evenness o di equipartizione (J'), sempre dalla tabella 12, si può vedere come questo tenda a diminuire all'interno delle piste percorse con entrambi i mezzi e in entrambe le condizioni di umidità. La diminuzione maggiore si presenta nel trattamento "cingolo asciutto" (-59%) per quanto riguarda la comunità degli azotofissatori e nel "gommato umido" (-18%) per quanto riguarda la comunità dei nitrificanti.

Riassumendo per la presente area di campionamento si possono mettere in evidenza questi cinque punti:

- (i) cambiamenti significativi, per la densità apparente e la porosità, dopo il passaggio dei veicoli forestali;
- (ii) l'impatto del trattore cingolato sembra essere influenzato dal contenuto di umidità solo per la resistenza al taglio;
- (iii) il terreno argilloso di Rincine ha presentato una compattazione rilevante, anche se il peso delle macchine era contenuto;

- (iv) i passaggi del trattore cingolato hanno avuto, dal punto di vista dei parametri biologici, un maggior impatto in presenza di un minor contenuto di umidità nel terreno;
- (v) le analisi genetiche hanno evidenziato una forte variazione del numero di specie - in confronto con il terreno indisturbato.

3.3.5 Conclusioni.

Dai rilievi effettuati in questa area possiamo notare come alcune proprietà fisiche del suolo siano significativamente modificate dal passaggio dei veicoli comunemente utilizzati per le operazioni di diradamento. Tali modifiche dipendono principalmente dall'umidità del terreno, dal tipo di veicolo (trattore gommato vs trattore cingolato) e dal numero di passaggi.

Il maggiore impatto negativo per tutte le variabili monitorate del suolo (densità apparente, porosità totale, resistenze a taglio e penetrazione) si è verificato facendo più passaggi con il trattore gommato in condizione di suolo umido. L'impiego del trattore a cingoli su suolo asciutto ha permesso di minimizzare gli effetti negativi sul suolo; tuttavia, per le stesse condizioni del terreno, il trattore gommato è solo leggermente più impattante rispetto al trattore cingolato (con trattori aventi massa simile). Possiamo affermare quindi che la scelta del momento più adatto, in termini di umidità del terreno, è una conclusione fondamentale per limitare la compattazione ed eventuali altri danni al suolo.

Un'altra osservazione da sottolineare è quella relativa alla programmazione ben definita delle piste; così facendo è possibile andare a confinare la compattazione del suolo ed inoltre salvaguardarne in modo sostanziale la qualità complessiva dello stesso. Ulteriori ricerche su questo argomento, anche attraverso una più ampia gamma di tipi di suolo e confronti tra diverse tipologie di cantiere, possono risultare interessanti per ampliare il quadro delle conoscenze sul tema.

La risposta da parte delle comunità microbiche al passaggio delle due tipologie di trattori ha evidenziato che, per quanto riguarda l'indice di Shannon si ha una discreta diminuzione di ricchezza di specie, soprattutto per gli azotofissatori, dal momento in cui per tre tipologie di trattamenti ("cingolo asciutto", "gommato asciutto" e "gommato umido") i valori sono inferiori a 1. Per quanto riguarda l'aumento dell'indice di Evenness o

di equipartizione (J'), ad esclusione del “gommato asciutto” (per gli azotofissatori) e del “cingolo umido” (per i nitrificanti) questo indica una riduzione dell'abbondanza della specie più comune tendendo ad una situazione più uniforme in termini di abbondanza di specie (Smith e Wilson, 1996).

4. Conclusioni.

Con questo lavoro è stato possibile contribuire allo sviluppo della ricerca relativa ai possibili impatti al suolo, legati soprattutto alla compattazione dello stesso, a seguito di interventi di utilizzazione forestale. Al fine di avere un quadro generale sul tema sono stati analizzati i cambiamenti all'interno di due cantieri, molto diversi tra loro per composizione e livello di meccanizzazione impiegato, ma con una comune finalità, ovvero di prendere in esame i cambiamenti, più o meno significativi, sul suolo post utilizzazione forestale.

Gli studi inerenti gli impatti delle utilizzazioni al suolo hanno visto negli ultimi anni un crescente interesse, soprattutto legato all'aspetto ecologico, ma ancora molti parametri ed aspetti possono essere indagati. Per questo motivo la tesi è stata incentrata sia su alcuni parametri maggiormente considerati in letteratura (parametri fisici del suolo) sia sulla relazione di questi con un fattore molto meno considerato in ambito forestale, ovvero quello microbiologico.

L'interazione tra questi due aspetti, oltre ad essere un strumento nuovo di valutazione dell'impatto possibile, è stato anche sostenuto dai buoni risultati che ha portato alla luce. Infatti le analisi genetiche hanno implementato le risposte date dagli altri parametri, ma hanno permesso di andare anche più nel dettaglio.

Da questa tesi sono emersi diverse conclusioni interessanti, tra le quali:

- (i) la correlazione tra i due tipi di parametri (fisici e biologici) e, soprattutto nel caso della prima area, l'accuratezza maggiore dell'aspetto microbiologico che evidenziava aspetti legati alle alterazioni sulle caratteristiche dei pori;
- (ii) la variazione della componente biologica del suolo sia in termini di qualità che di quantità dopo il passaggio dei mezzi. Questo aspetto sottolinea le importanti informazioni, a livello biologico le quali possono rappresentare un utile background per pianificare il ripristino della zona a livello ambientale e produttivo;
- (iii) in generale appare quindi importante sottolineare la necessità, dove possibile, di non limitarsi ad analizzare solo i parametri fisici ma correlarli con gli aspetti microbiologici del suolo;
- (iv) altro aspetto messo in evidenza è stato quello del momento più adatto, in termini di umidità del terreno, per le operazioni in bosco con le macchine. Questa è una

conclusione fondamentale per limitare la compattazione ed eventuali altri danni al suolo.

- (v) un'ultima osservazione da sottolineare è quella relativa alla pianificazione ben definita delle piste; così facendo è possibile confinare la compattazione del suolo ed inoltre salvaguardare in modo sostanziale la qualità complessiva del suolo.

Nel caso dei rilievi in campo di questa tesi, soprattutto nella seconda area analizzata, ci possiamo ritenere fortunati in quanto gli operatori dell'Unione dei Comuni Valdarno e Valdisieve si sono resi disponibili alla programmazione. I risultati sono stati dunque soddisfacenti ma molte cose devono e possono essere ancora osservate ed analizzate. Per esempio potrebbe essere interessante:

1. fare delle prove di germinabilità a seguito di una situazione di suolo compattato, e con questa vedere reazioni di tipo fisiologico, come la fotosintesi e traspirazioni di foglie;
2. vedere il cambiamento a livello di respirazione del suolo, analisi questa strettamente legata all'aspetto della porosità;
3. valutare i cambiamenti anche della componente fungina, oltre quella di altre comunità batteriche;
4. analisi legate alla variazione della diversità biologica potrebbero essere svolte anche in relazione alla stagionalità a seguito di interventi di utilizzazione di questo tipo. Con la stagionalità infatti variano le comunità microbiche e le conseguenze di un eventuale impatto al suolo si potrebbero accentuare o ridurre; cosa che richiederebbe appunto un approfondimento di indagine.

Indipendentemente dalla stagionalità sarebbe interessante vedere se a distanza di tempo si recupera la diversità e la ricchezza di specie presenti nel controllo.

Ulteriori ricerche su questo argomento, attraverso una più ampia gamma di tipi di suolo e confronti tra i diversi sistemi di registrazione, sono necessarie.

5. Bibliografia.

- Adams, P., Froehlich, H. 1981. Compaction of forest soils. PNW 217. A Pacific Northwest Extension Publication. Oregon, Washington, Idaho, USA, p.16.
- Agherkakli, B., Najafi, A., Sadeghi, S. 2010. Ground based operation effects on soil disturbance by steel tracked skidder in a steep slope of forest. *Journal of Forest Science* 56, 278–284.
- Alakukku, L., Weiskopf, P., Chamen, W.C., Tijink, F.G., van der Linden, J., Pires, S., Sommer, C., Spoor, G. 2003. Prevention strategies for field traffic-induced subsoil compaction: a review. *Soil and Tillage Research* 73, 145–160
- Ampoorter, E., Goris, R., Cornelis, W.M., Verheyen, K. 2007. Impact of mechanized logging on compaction status of sandy forest soils. *Forest Ecology and Management* 241, 162–174
- Ampoorter E, Van Nevel L, De Vos B, Hermy M, Verheyen K. 2010. Assessing the effects of initial soil characteristics, machine mass and traffic intensity on forest soil compaction. *Forest Ecol Manag* 260 : 1664–1676.
- Ampoorter, E., Schrijver, A., Nevel, L., Hermy, M., Verheyen, K. 2012. Impact of mechanized harvesting on compaction of sandy and clayey forest soils: results of a meta-analysis. *Annals of Forest Science* 69, 533–542.
- Aragon, A., Garcia M.G., Filgueira R.R., Pachepsky Ya.A. 2000. Maximum compactibility of Argentina soils from the Proctor test: The relationship with organic matter and water content. *Soil and Tillage Research* 56, 197–204.
- Ares, A., Terry, T., Miller, R., Anderson, H., Flaming, B. 2005. Ground-based forest harvesting effects on soil physical properties and Douglas-fir growth. *Soil Science Society of America Journal* 69, 1822–1832
- Archibold, O.W. 1989. Seed banks and vegetation processes in coniferous forest. In: Leck, MA, Parker, VT, Simpson, RL (Eds.), *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 107–122.
- Arthur, E., Schjønning, P., Moldrup, P., Tuller, M., de Jonge, L.W. 2013. Density and permeability of a loess soil: Long-term organic matter effect and the response to compressive stress. *Geoderma* 193–194, 236–245.

- Ball, B.C., Lang R.W., O'Sullivan M.F., Franklin M.F. 1989. Cultivation and nitrogen requirements for continuous winter barley on a Gleysol and a Cambisol. *Soil Tillage Res.* 13:333–352.
- Bakken, L.R., Børresen, T., Njøs, A. 1987. Effect of soil compaction by tractor traffic on soil structure, denitrification, and yield of wheat *Triticum aestivum* L. *Journal of Soil Science* 38, 541–552.
- Berli, M., Kulli, B., Attinger, W., Keller, M., Leuenberger, J., Flühler, H., Springman, S.M., Schulin, R. 2004. Compaction of agricultural and forest subsoils by tracked heavy construction machinery. *Soil and Tillage Research* 75, 37–52.
- Brais, S., Camiré, C. 1998. Soil compaction induced by careful logging in the clay belt region of northwestern Quebec (Canada). *Canadian Journal of Soil Science*, 78 (1): 197-206.
- Brais, S. 2001. Persistence of soil compaction and effects on seedling growth in northwestern Quebec. *Soil Sci. Soc. Am, J.* 65:1263-1271.
- Busse, M.D., Beattie, S.E., Powers, R.F., Sanchez, F.G., Tiarks, A.E. 2006. Microbial community responses in forest mineral soil to compaction, organic matter removal, and vegetation control. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 577–588.
- Bygdén, G., Eliasson, L., Wästerlund, I. 2004. Rut depth, soil compaction and rolling resistance when using bogie tracks. *Journal of Terramechanics* 40, 179–190.
- Cavalli, R. 1991. La mobilità dei veicoli agricoli e forestali sui terreni declivi. *Contributi scientifico-pratici per una migliore conoscenza ed utilizzazione del legno* 38: 161-173.
- Chow ML, Radomski CC, McDermott JM, Davies J, Axelrood PE. 2002. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. *FEMS Microbiol Ecol* 42 : 347–357.
- Conlin, T., Driessche, R. 2000. Response of soil CO₂ and O₂ concentrations to forest soil compaction at the long-term soil productivity sites in central British Columbia. *Canadian Journal of Soil Science*, 3, 625–632.
- Conlin, T.S.S., van den Driessche, R. 1996. Short-term effects of soil compaction on growth of *Pinus contorta* seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 727–739.
- Currie, J.A. 1984. Gas diffusion through soil crumbs: the effects of compaction and wetting. *Journal of Soil Science* 35, 1–10.

- Day, S.D., Bassuk, N.L. 1994. A review of the effects of soil compaction and amelioration treatments on landscape trees. *J. Arboric.* 20, 9–17.
- Dick, R.P., Myrold, D.D., Kerle, E.A. 1988. Microbial biomass and enzyme activities in compacted and rehabilitated skid trail soils. *Soil Science Society of America Journal* 52, 512–516.
- Donnelly, J.R., Shane, J.B. 1986. Forest ecosystem responses to artificially induced soil compaction. I. Soil physical properties and tree diameter growth. *Can. J. For. Res.* 16, 750–754.
- Eliasson, L. 2005. Effects of forwarder tyre pressure on rut formation and soil compaction. *Silva Fennica* 39, 549–557.
- Eliasson, L., Wästerlund, I. 2007. Effects of slash reinforcement of strip roads on rutting and soil compaction on a moist fine-grained soil. *Forest Ecology and Management* 252, 118–123.
- Ellies Sch, A., Smith, R.R., Jose Dorner, F.J., Proschle, T.A. 2000. Effect of moisture and transit frequency on stress distribution on different soils. *Agro Sur*, 28: 60–68.
- Foltz, R.B. 1995. Sediment reduction from the use of lowered tyre pressures. In: *Central tyre inflation systems: managing the vehicle to surface*. U.S. Forest Service, Intermountain Research Station, Warrendale, USA.
- Frey, B., Kremer, J., Rüdts, A., Sciacca, S., Matthies, D., Lüscher, P. 2009. Compaction of forest soils with heavy logging machinery affects soil bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology* 45, 312–320.
- Frey, B., Niklaus, P.A., Kremer, J., Lüscher, P., Zimmermann, S. 2011. Heavy machinery traffic impacts methane emission, abundance of methanogens and community structure in oxic forest soils. *Appl Environ Microbiol.* 77, 6060-6068.
- Gaertig, T., Schack-Kirchner, H., Hildebrand E.E., von Wilpert, K. 2002. The impact of soil aeration on oak decline in southwestern Germany. *Forest Ecology and Management* 159, 15-25.
- Gee G.W., Bauder J.W. 1986. Particle-size analysis. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Second ed., Part I. Agron. Monogr., 9*. ASA and SSSA, Madison, WI, USA, pp. 383–411.
- Gomez, A., Powers, R.F., Singer, M.J., Horwath, W.R. 2002. Soil compaction effects on growth of young ponderosa pine following litter removal in California's Sierra Nevada. *Soil Science Society of America Journal.* 66:1334-1343.

- Goutal, N., Parent, F., Bonnaud, P., Demaison, J., Nourrisson, G., Epron, D., Ranger, J. 2012. Soil CO₂ concentration and efflux as affected by heavy traffic in forest in northeast France. *Eur J Soil Sci* 63: 261–271.
- Goutal, N., Keller, T., Défossez, P., Ranger, J. 2013. Soil compaction due to heavy forest traffic: measurements and simulations using an analytical soil compaction model. *Annals of Forest Science* 70: 545-556.
- Grant, R.F. 1993. Simulation model of soil compaction and root growth. II. Model performance and validation. *Plant Soil* 150, 15–24.
- Greacen, E.L., Sands, R. 1980. Compaction of forest soils. A review. *Australian Journal of Soil Research* 18, 163–189.
- Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, Fancelli S, Fani R. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol Lett* 127:85–91
- Grigal, D.F. 2000. Effects of extensive forest management on soil productivity. *Forest Ecol Manag* 138: 167–185.
- Hallonborg, U. 1996. Super ellipse as tyre-ground contact area. *Journal of Terramechanics* 33, 125–132.
- Halpern, C.B., Evans, S.A., Nielson, S. 1999b. Soil seed banks in young, closed-canopy forests of the Olympic Peninsula, Washington: potential contributions to understory reinitiation. *Can. J. Bot.*, 77, 922-935
- Han, H-S., Page-Dumroese, D. S., Han, S-K., Tirocke, J. 2006. Effect of slash, machine passes, and soil moisture on penetration resistance in a cut-to-length harvesting. *International Journal of Impact Engineering* 17, 11–24.
- Hathaway-Jenkins, L.J., Godwin, R.J., Pearce, B., Sakrabani, R., Whitmore, A. 2010. A comparison between conventional and organic farming practices; 1: soil physical properties. In: 19th World Congress of Soil Science, Brisbane, Australia, 1-6 August 2010, p. 4.
- Hartmann, M., Howes, CG., VanInsberghe, D., Yu, H., Bachar, D., Christen, R., et al. 2012. Significant and persistent impact of timber harvesting on soil microbial communities in Northern coniferous forest. *International Society for Microbial Ecology J* 6, 2199-2218.

- Hartmann, M., Niklaus, P. a, Zimmermann, S., Schmutz, S., Kremer, J., Abarenkov, K., Lüscher, P., Widmer, F., Frey, B. 2014. Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *The ISME journal*, 8: 226–244.
- Heinemann, H R. 2007. Forest operations engineering and management- the ways behind and ahead of a scientific discipline. *Croatian Journal of Forest Engineering* 28, 107–121.
- Heninger, R., Scott, W., Dobkowski, A., Miller, R., Anderson, H., Duke, S. 2002. Soil disturbance and 10-year growth response of coast Douglas-fir on non-tilled and tilled skid trails in the Oregon Cascades. *Can. J. For. Res.* 32: 233-246.
- Herbauts, J., El-Bayad, J., Gruber, W. 1996. Influence of log- ging traffic on the hydromorphic degradation of acid forest soils developed on loessic loam in middle Belgium. *For. Ecol. Manage.* 87: 193–207.
- Hillel, D. 1998. *Environmental Soil Physics*. Academic Press, San Diego, CA
- Horn, R., Blackwell, P.S., White, R. 1989. The effect of speed of wheeling on soil stresses, rut depth and soil physical properties in an ameliorated transitional red-brown earth. *Soil and Tillage Research* 13, 353–364.
- Horn, R., Vossbrink, J., Backer, S. 2004. Modern vehicles and their impacts on soil physical properties. *Soil and Tillage Research* 79, 207-219.
- Horn, R., Vossbrink, J., Peth, S., Becker, S. 2007. Impact of modern forest vehicles on soil physical properties. *Forest Ecology and Management* 248, 56–63.
- Hillel, D., 1998. *Environmental Soil Physics*. Academic Press, San Diego, CA.
- Labelle, E. R., Jeager, D. 2011. Soil compaction caused by cut-to- length forest operations and possible short-term natural rehabilitation of soil density. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 2314-2329.
- Li, Q., Lee Allen, H., Wollum II, A.G. 2004. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. *Soil Biology and Biochemistry* 36 (4), 571–579.
- Lysne, D.H., Burditt, A.L. 1983. Theoretical ground pressure distributions of log skidders (forest equipment). *Trans. ASAE* 26, 1327–1331.
- Jansson, K., Johansson, J. 1998. Soil changes after traffic with a tracked and a wheeled forest machine: a case study on a silt loam in Sweden. *Forestry* 71, 57–66.

- Jansson, K.J., Wästerlund, I. 1999. Effect of traffic by lightweight forest machinery on the growth of young *Picea abies* trees. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14, 581–588.
- Johnson, D.L., Curtis, P.S. 2001. Effects of forest management on soil C and N storage: meta analysis. *Forest Ecology and Management* 140, 227–238.
- Jordan D, Li F, Ponder F, Berry EC, Hubbard VC, Kim KY.1999. The effects of forest practices on earthworm populations and soil microbial biomass in a hardwood forest in Missouri. *Appl Soil Ecol* 13: 31–38
- Jordan, D., Ponder, F. Jr., Hubbard, V.C. 2003. Effects of soil compaction, forest leaf litter and nitrogen fertilizer on two oak species and microbial activity. *Applied Soil Ecology* 23, 33–41
- Jourgholami, M., Majnounian, B. 2011. Effects of wheeled cable skidder on rut formation in skid trail - a case study in Hyrcanian forest. *Journal of Forestry Research* 22, 465-469.
- Jourgholami, M., Shoukuh, S., Maryam, E., Eric, K.Z. 2013. Influence of slope on physical soil disturbance due to farm tractor forwarding in a Hyrcanian forest of northern Iran. *iForest*.
- Jurgensen, M.F., Harvey, A.E., Graham, R.T., Page-Dumroese, D.S., Tonn, J.R., Larsen, M.J., Jain, T.B. 1997. Impacts of timber harvesting on soil organic matter, nitrogen, productivity, and health of inland Northwest Forests. *Forest Science* 43, 234–251.
- Kirk J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58, 169-188.
- Koolen, A.J., Lerink, P., Kurstjens, D.A.G., van den Akker, J.J.H., Arts, W.B.M. 1992. Prediction of aspects of soil-wheel systems. *Soil and Tillage Research* 24, 381–396.
- Kowalchuk, G.A., Drigo, B., Yergeau, E., van Veen J.A. 2006. Assessing bacterial and fungal community structure in soil using ribosomal RNA and other structural gene markers. *Soil Biology* 8, 159-188.
- Magagnotti, N., Spinelli, R., Guldner, O., Erler, J. 2012. Site impact after motor-manual and mechanised thinning in Mediterranean pine plantations. *Biosystems Engineering* 113, 140-147.

- Marchi, E., e Piegai, F. 2001. Sistemi di utilizzazione forestale a basso impatto ambientale. *L'Italia Forestale e Montana* 6, 477-490.
- Mariani, L., Chang, S.X., Kabzems, R. 2006. Effects of tree harvesting, forest floor removal, and compaction on soil microbial biomass, microbial respiration, and N availability in a boreal aspen forest in British Columbia. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1734-1744
- Marshall, V.G. 2000. Impacts of forest harvesting on biological processes in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*, 133: 43-60.
- McDonald, T.P., Stokes, B.J., Aust, W.M. 1995. Soil physical property changes after skidder traffic with varying tire widths. *Journal of Forest Engineering*. 6, 41–50.
- McDonald, T.P., Seixas, F. 1997. Effect of Slash on Forwarder Soil Compaction. *Journal of Forest Engineering* 8, 15-26
- McNabb, D., Startsev, A., Nguyen, H. 2001. Soil wetness and traffic level effects on bulk density and air-filled porosity of compacted boreal forest soils. *Soil Science Society of America Journal* 65, 1238–1247.
- Mocali, S., Paffetti, D., Emiliani, G., Benedetti, A., Fani, R. 2007. Diversity of heterotrophic aerobic cultivable microbial communities of soils treated with fumigants and dynamics of metabolic, microbial, and mineralization quotients. *Biology and Fertility of Soils*. 44, 557-569.
- Murach D, Isle L, Klapproth F, Parth A, Wiedemann H. 1993. Rhizotron-Experimente zur Wurzelverteilung der Fichte. *Forstarchiv* 64: 191-194.
- Muro, T. 1982. Tyres/wheels and tracks state-of-the-art report. *Journal of Terramechanics* 19, 55–69.
- Naghdi, R., Bagheri, I., Lotfalian, M., & Setodeh, B. 2009. Rutting and soil displacement caused by 450C Timber Jack wheeled skidder (Asalem forest northern Iran). *Journal Of Forest Science* 55, 177–183.
- Najafi, A., Solgi, A., Sadeghi, S.H. 2010. Effects of skid trail slope and ground skidding on soil disturbance. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 8, 13–23
- Neri, F., Spinelli, R., Lyons, J. 2007. Ground pressure forwarder trials: assess benefits in reducing wheel rutting, in: *Ground Pressure Forwarder Trials: Assess Benefits in Reducing Wheel Rutting. Austro2007/ FORMEC 2007- Meeting the Needs of Tomorrows' Forests – New Developments in Forest Engineering*, pp. 1–10.

- Novara, A., Armstrong, A., Gristina, L., Semple, K.T. and Quinton, J.N. 2012. Effects of soil compaction, rain exposure and their interaction on soil carbon dioxide emission. *Earth Surface Processes and Landforms* 37, 994-999.
- Nugent, C., Kanali, C., Owende, P.M.O., Nieuwenhuis, M., Ward, S. 2003. Characteristic site disturbance due to harvesting and extraction machinery traffic on sensitive forest sites with peat soils. *Forest Ecology and Management*. 180, 85–98.
- Page-Dumroese, D.S., Jurgensen, M.F., Tiarks, A.E., Ponder, F.Jr., Sanchez, F.G., Fleming, R.L., Kranabetter, J.M., Powers, R.F., Stone, D.M., Elioff, J.D., Scott, D.A. 2006. Soil physical property changes at the North American Long-Term Soil Productivity study sites: 1 and 5 years after compaction. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 551–564.
- Picchio, R., Neri, F., Petrini, E., Verani, S., Marchi, E., Certini, G. 2012. Machinery-induced soil compaction in thinning two pine stands in central Italy. *Forest Ecology and Management* 285, 38–43.
- Pielou, E. C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* 13, 131-144.
- Pinard, M., Barker, M., Tay, J. 2000. Soil disturbance and post-logging forest recovery on bulldozer paths in Sabah, Malaysia. *Forest Ecology and Management*, 130: 213–225.
- Ponder, F., Tadros, M. 2002. Phospholipid fatty acids in forest soil four years after organic matter removal and soil compaction. *Applied Soil Ecology* 19, 173–182.
- Porteous, L.A., Seidler, R.J. and Watrud, L. S. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology*. 6, 787-791.
- Powers, R.F., Scott, D.A., Sanchez, F.G., Voldseth, R.A., Page-Dumroese, D., Elioff, J.D., Stone, D.M. 2005. The North American long-term soil productivity experiment: findings from the first decade of research. *Forest Ecology and Management*, 220: 31–50
- Rab, M. A. 1996. Soil physical and hydrological properties following logging and slash burning in the *Eucalyptus regnans* forest of southeastern Australia. *Forest Ecology and Management* 84, 159–176.
- Radford, B.J., Wilson-Rummenie, A.C., Simpson, G.B., Bell, K.L., Ferguson, M.A. 2001. Compacted soil affects soil macrofauna populations in a semi-arid environment in Central Queensland. *Soil Biol Biochem* 33:1869-1872.

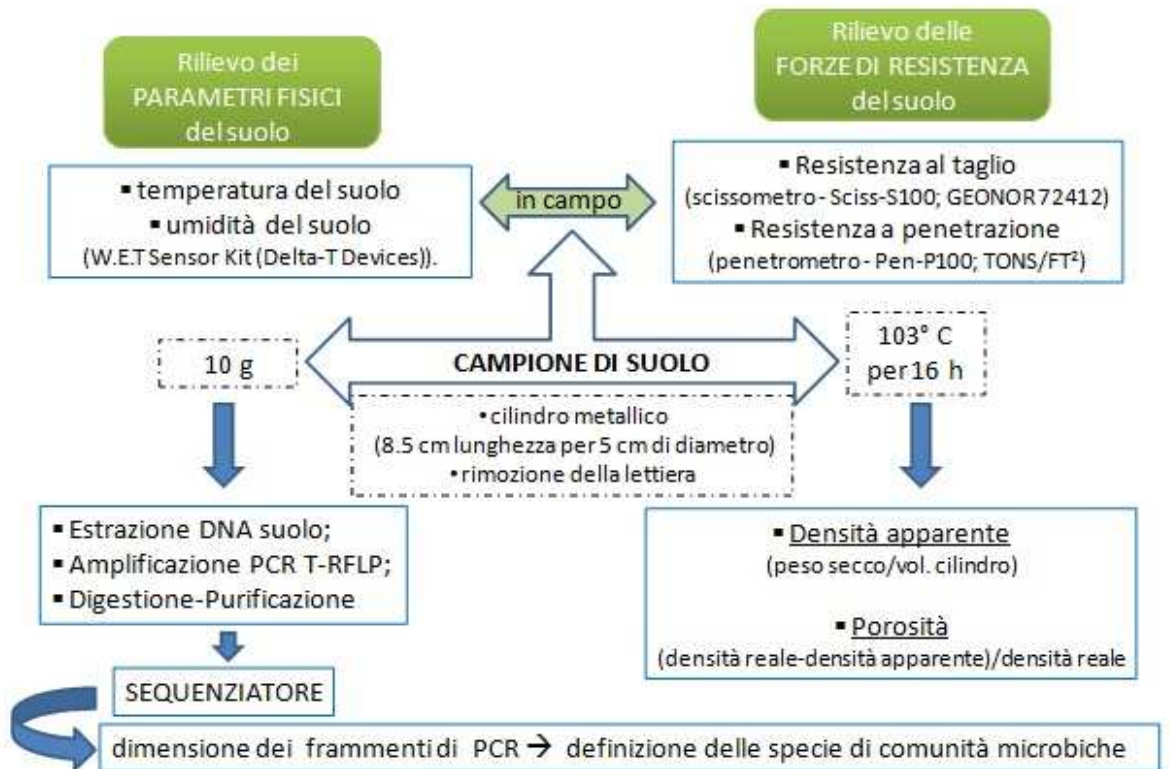
- Raper, R.L. 2005. Agricultural traffic impacts on soil. *Journal of Terramechanics* 42, 259–280.
- Roberts, M.R., Dong, H. 1993. Effects of soil organic layer removal on regeneration after clear-cutting a northern hardwood stand in New Brunswick. *Can. J. Per. Res.*, 23 (1993), pp 2093-2100.
- Rossi, O., Giavelli, G. 1983. Some comments and perspectives on the utilization of species diversity indices in ecology. *Acta Naturalia de l'Ateneo Parmense*, 19: 25-34.
- Saarilahti, M. 2002. Soil Interaction Model. Appendix Report No 3. Evaluation of the WES-method in assessing the trafficability of terrain and the mobility of forest tractors. Part 2: WES mobility models. Quality of life and Management of Living Resources Contract No. QLK5-1999-00991 (1999-2002).
- Sakai, H., Nordfjell, T., Suadicani, K., Talbot, B., Bøllehuus, E. 2008. Soil compaction on forest soils from different kinds of tyres and tracks and possibility of accurate estimate. *Croatian Journal of Forest Engineering* 29, 15–27.
- Schack-Kirchner H. 1994 Struktur und Gashaushalt von Waldböden, vol 112. *Berichte Forschungszentrum Waldoökosysteme Univ. Göttingen, Reihe A.*
- Schumacher, T.E., Smucker, A.J.M. 1981. Mechanical impedance effects on oxygen uptake and porosity of drybean roots. *Agron. J.* 75, 51–55.
- Seixas, F., McDonald, T. 1997. Soil compaction effects of forwarding and its relationship with 6- and 8-wheel drive machines. *Forest Products Journal* 47, 46–52.
- Seixas, F., Koury, C.G.G., Costa, L.G. 2003. Soil compaction and GPS determination of impacted area by skidder traffic. In: *Proceedings of the 2nd Forest Engineering Conference. Techniques and Methods, Växjö, Zweden*, pp. 124–128
- Schäffer J, Hartmann R, Wilpert Kv. 2001. Effects of timber harvesting with tracked harvesters on physical soil properties. In: Johansson J (ed) *Proceedings from the third (final) meeting of a Concerted Action: excavators and Backhoe Loaders as Base Machines in Forest Operations; Pisa, Italy, 20 September 2000 to 22 September 2000.* SLU, Uppsala, Research Note No. 11, pp 119–124.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27, 379–423.
- Shestak, C.J., Busse, M.D. 2005. Compaction alters physical but not biological indices of soil health. *Soil Science Society of America Journal* 69, 236–246.

- Schnurr-Putz, S., Baath, E., Guggenberger, G., Drake, H.L., Kusel, K. 2006. Compaction of forest soil by logging machinery favours occurrence of prokaryotes. *FEMS Microbiol Ecol* 58,503–516.
- Sheridan G. 2003. A comparison of rubber-tyred and steel-tracked skidders on forest soil physical properties. *Australian Journal of Soil Research*, 41: 1063–1075.
- Shestak, C.J., Busse, D. 2005. Compaction Alters Physical but Not Biological Indices of Soil Health. *American Society of Agronomy* 69, 236-246.
- Smith, C.W. 2003. Does soil compaction on harvesting extraction roads affect long-term productivity of Eucalyptus plantations in Zululand, South Africa? *S. Afr. For. J.* 199: 41-53.
- Smith B. and J. B.Wilson 1996. A consumer's guide to evenness indices. *Oikos* 76:70–82.
- Smith C.J., Danilowicz B.S., Clear A.K., Costello F.J., Wilson B., Meijer W.G. 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 375–380.
- Soane, B.D. 1990. The role of organic matter in soil compactibility: A review of some practical aspects. *Soil and Tillage Research* 16, 179–201.
- Spinelli, R. 1995. Le conseguenze ambientali della meccanizzazione nei diradamenti boschivi: la situazione in Europa. *Linea Ecologica* 1, 18-24.
- Startsev, N.A., McNabb, D.H., Startsev, A.D. 1998. Soil biological activity in recent clearcuts in west-central Alberta. *Canadian Journal of Soil Science* 78, 69–76.
- Šušnjar, M., Horvat, D., Šešelj, J. 2006. Soil compaction in timber skidding in winter conditions. *Croatian Journal of Forest Engineering* 27, 3–15.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Tan X, Chang SX, Kabzems R. 2008. Soil compaction and forest floor removal reduced microbial biomass and enzyme activities in a boreal aspen forest soil. *Biol Fert Soils* 44 : 471–479.
- Taylor, H.M., Brar, G.S., 1991. Effect of soil compaction on root development. *Soil and Tillage Research* 19, 37–52.
- Teepe, R., Brumme, R., Beese F., Ludwig, B. 2004. Nitrous Oxide Emission and Methane Consumption Following Compaction of Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 68 (2): 605-611.

- Wallbrink, P.J., Roddy, B.P., Olley, J.M. 2002. A tracer budget quantifying soil redistribution on hill slopes after forest harvesting. *Catena* 47, 179–201
- Whalley, W.R., Dumitru, E., Dexter, A.R. 1995. Biological effects of soil compaction. *Soil and Tillage Research* 35, 53–68.
- Williamson, J.R., Neilsen, W.A. 2000. The influence of forest site on rate and extent of soil compaction and profile disturbance of skid trails during ground-based harvesting. *Canadian Journal of Forest Research*, 30: 1196-1205.
- Wong, J.Y., 2008. *Theory of Ground Vehicle*. Wiley, USA, p. 592.
- Worrell, R., Hampson, A. 1997. The influence of some forest operations on the sustainable management of forest soils – a review. *Forestry*, 70: 61.85.
- Wronski, E.B., Murphy, G. 1994. Responses of forest crops to soil compaction. In: Sloane, B.D., Ouwerkerk, C.V. (Eds.), *Soil Compaction in Crop Production*. Elsevier, Amsterdam, pp. 317–342.
- Yong, R.N., Fattah, E.A., Skiadas, N. 1984. *Vehicle Traction Mechanics*. Elsevier Science Pub. Co., Inc., New York, NY

Allegati

Allegato 1 - Schema di raccolta ed elaborazione campioni.



Allegato 2 - Tabella relativa alle specie di San Rossore.

Anno	Campioni	<i>nifH</i>											
Controllo	1_6	Sp 1	Sp 2	Sp 3						Sp 9	Sp 10		Sp 12
	1_7	Sp 1						Sp 8					
	1_9	Sp 1								Sp 9	Sp 10	Sp 11	
	2_4		Sp 2	Sp 3						Sp 9	Sp 10		Sp 12
	2_5	Sp 1						Sp 8					
	2_9	Sp 1	Sp 2	Sp 3									
	3_4	Sp 1	Sp 2	Sp 3									
	3_9		Sp 2	Sp 3									Sp 12
	3_10	Sp 1	Sp 2	Sp 3									Sp 12
2011	3_7	Sp 1		Sp 3	Sp 4		Sp 6		Sp 8				
	3_12		Sp 2	Sp 3									
	3_16	Sp 1	Sp 2										
	2_8	Sp 1	Sp 2	Sp 3									
	2_25	Sp 1	Sp 2	Sp 3			Sp 6	Sp 7					
	2_10	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4		Sp 6	Sp 7					
2006	5_2		Sp 2	Sp 3	Sp 4								
	5_18	Sp 1					Sp 6						
	5_24	Sp 1	Sp 2	Sp 3									
	4_6		Sp 2	Sp 3									
	4_14	Sp 1					Sp 5	Sp 6					
	4_11	Sp 1		Sp 3	Sp 4			Sp 6					

Anno	Campioni	amo							
Controllo	1_6		Sp 2				Sp 6		Sp 8
	1_7	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6		
	1_9		Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6		Sp 8
	2_4		Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5			Sp 8
	2_5		Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	
	2_9		Sp 2		Sp 4				
	3_4		Sp 2	Sp 3		Sp 5			Sp 8
	3_9		Sp 2				Sp 6		Sp 8
	3_10						Sp 6		Sp 8
2011	3_7	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6		Sp 8
	3_12	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	Sp 8
	3_16	Sp 1	Sp 2		Sp 4	Sp 5	Sp 6		Sp 8
	2_8		Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6		Sp 8
	2_25		Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	
	2_10	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	
2006	5_2		Sp 2	Sp 3			Sp 6		Sp 8
	5_18	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	
	5_24	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	
	4_6		Sp 2		Sp 4				
	4_14	Sp 1	Sp 2		Sp 4	Sp 5		Sp 7	
	4_11		Sp 2		Sp 4	Sp 5	Sp 6	Sp 7	

Allegato 3 – Tabella relativa alle specie di Rincine.

Mezzi	Campioni	<i>nifH</i>					
controllo	1_2	Sp1	Sp 3	Sp4			
	1_3						
	1_4	Sp1					
	1_9	Sp1	Sp 3		Sp 5		
	1_13	Sp1					
	1_15	Sp1	Sp 3				
	1_20	Sp1	Sp 3				
	1_23						
	1_26	Sp1	Sp 3	Sp4			
	1_28	Sp1					
	2_1	Sp1			Sp 5		
	2_6	Sp1	Sp 3				
	2_9						
	2_11		Sp 3				
	2_13	Sp1	Sp 2				
	2_18						
	2_20	Sp1			Sp 5		
	2_23						
	2_26						
	2_29	Sp1	Sp 3	Sp4			
	3_4	Sp1	Sp 3	Sp4			
	3_5	Sp1	Sp 3	Sp4			
	3_6						
	3_8						
	3_13	Sp1					
	3_16						
	3_18						
	3_21	Sp1	Sp 3				
	3_23	Sp1	Sp 3				
	3_30	Sp1	Sp 3	Sp4			
gommato asciutto	1			Sp6	Sp 7		
	2				Sp 7		
	3			Sp6	Sp 7		
	4			Sp6	Sp 7		
	6			Sp6	Sp 7		
	7			Sp6			
	8			Sp6	Sp 7		
	cingolo asciutto	1			Sp6		
2				Sp6			
3				Sp6		Sp 8	
4				Sp6			
5						Sp 8	
6				Sp6	Sp 7		
7				Sp6	Sp 7	Sp 8	
8				Sp6		Sp 8	
gommato umido	1			Sp6	Sp 7		
	2			Sp6	Sp 7		
	3			Sp6	Sp 7		
	4			Sp6			
	5				Sp 7		
	6				Sp 7		
	7			Sp6	Sp 7		
	8			Sp6	Sp 7		
cingolo umido	1			Sp6	Sp 7		
	2			Sp6	Sp 7		
	3			Sp6	Sp 7		
	4			Sp6	Sp 7		
	5						
	6			Sp6	Sp 7	Sp 8	
	7			Sp6	Sp 7	Sp 8	
	8			Sp6	Sp 7		

Mezzi	Campioni	amo									
controllo	1_2	Sp 1	Sp 2		Sp4			Sp 7			
	1_3	Sp 1									
	1_4	Sp 1	Sp 2		Sp4			Sp 7	Sp 8		
	1_9		Sp 2					Sp 7	Sp 8		
	1_13	Sp 1	Sp 2					Sp 7		Sp9	
	1_15	Sp 1	Sp 2					Sp 7		Sp9	
	1_20						Sp6				
	1_23	Sp 1	Sp 2	Sp 3			Sp6	Sp 7	Sp 8	Sp9	
	1_26		Sp 2	Sp 3	Sp4						
	1_28		Sp 2					Sp 7	Sp 8		
	2_1	Sp 1	Sp 2	Sp 3			Sp6	Sp 7	Sp 8	Sp9	
	2_6										
	2_9	Sp 1	Sp 2		Sp4			Sp 7	Sp 8	Sp9	
	2_11							Sp 7			
	2_13		Sp 2			Sp 5					
	2_18	Sp 1	Sp 2				Sp6	Sp 7	Sp 8		
	2_20	Sp 1	Sp 2						Sp 8		
	2_23	Sp 1	Sp 2					Sp 7	Sp 8	Sp9	
	2_26	Sp 1	Sp 2					Sp 7	Sp 8	Sp9	
	2_29		Sp 2		Sp4			Sp 7			
	3_4		Sp 2		Sp4			Sp 7			
	3_5		Sp 2		Sp4			Sp 7			
	3_6	Sp 1	Sp 2	Sp 3			Sp6	Sp 7	Sp 8	Sp9	
	3_8	Sp 1	Sp 2				Sp6	Sp 7	Sp 8		
	3_13	Sp 1	Sp 2			Sp 5		Sp 7	Sp 8		
	3_16	Sp 1	Sp 2			Sp 5	Sp6	Sp 7	Sp 8		
	3_18									Sp9	
	3_21	Sp 1	Sp 2					Sp 7	Sp 8		
	3_23		Sp 2				Sp6				
	3_30		Sp 2		Sp 4	Sp 5		Sp 7			
	gommato asciutto	1		Sp 2		Sp 5	Sp6		Sp 8	Sp9	Sp 10
		2									
		3								Sp9	
4			Sp 2						Sp9		
5			Sp 2								
6			Sp 2		Sp 5	Sp6			Sp9	Sp 10	
7		Sp 1	Sp 2		Sp 5	Sp6			Sp9	Sp 10	
8		Sp 1	Sp 2		Sp 5	Sp6			Sp9	Sp 10	
cingolo asciutto	1		Sp 2		Sp 5	Sp6			Sp9	Sp 10	
	2	Sp 1	Sp 2		Sp 5	Sp6	Sp 8	Sp9	Sp 10		
	3		Sp 2		Sp 5	Sp6		Sp9	Sp 10		
	4							Sp9			
	5		Sp 2								
	6							Sp9	Sp 10		
	7		Sp 2		Sp 5	Sp6		Sp9	Sp 10		
	8		Sp 2		Sp 5	Sp6		Sp9	Sp 10		
gommato umido	1		Sp 2			Sp6	Sp 8		Sp 10		
	2		Sp 2						Sp 10		
	3		Sp 2			Sp6					
	4							Sp9			
	5		Sp 2								
	6		Sp 2					Sp9			
	7		Sp 2			Sp6	Sp 8		Sp 10		
	8		Sp 2			Sp6			Sp 10		
cingolo umido	1								Sp 10		
	2		Sp 2						Sp 10		
	3				Sp 5						
	4		Sp 2								
	5		Sp 2					Sp9			
	6								Sp 10		
	7								Sp 10		
	8							Sp9	Sp 10		

Allegato 4 – Banca dati per analisi di sequenza e per la costruzione delle mappe di restrizione per il frammento nifH.

Allineamento aminoacidico del Nucleotide-binding sites (chemical binding site)

	10		20		30		40		50		60		70		80	
			*		*		*		*		*		*		*	
Feature 1			# # ###						# # #							
INIP_A	3		RQCAIYKGGIGKSTTTQNLVAALA	emGKKVMIVGCDPKADSTRLLIL	hskaqntimemaaeagtvedleledvlka	GYGG	82									
gi 114867	36		QIIAIYKGGISGKSTFTLANLSHMMA	emGKRVLVLLIGCDPKSDTTSLLF	ggkncptiietatkkklageevkvgdvcf	KSGG	115									
gi 21263466	1		MKLAVYKGGIGKSTTSCNISVALA	krGKKVLQIGCDPKHDSFTFLT	gfliptiidtlqekdyhyedvwpedviyk	GYGG	80									
gi 34494831	1		MKIIVYKGGIGKSTTSCNISIALA	rrGKKVLQIGCDPKHDSFTFLT	gfliptiidtlqlkdyhyedvwpedviyk	GYGG	80									
gi 1705819	1		MKLAVYKGGIGKSTTSCNISVALA	skrGKKVLQIGCDPKHDSFTFLT	gfliptiidtlqakdyhyedvwpedviyk	GYGG	80									
gi 33090219	1		MKLAVYKGGIGKSTTSCNISIALA	rrGKKVLQIGCDPKHDSFTFLT	gfliptiidtlqakdyhyedvwpedviyq	GYGE	80									
gi 510966	1		MKLAVYKGGIGKSTTSCNISIALA	krGKKVLQIGCDPKHDSFTFLT	gfliptiidtlsskdyhyediwpedviyq	GYGG	80									
gi 13878359	1		MIIIVYKGGIVGKSTTTSNLAVAIA	keGKRVLQIGCDPKSDSTFTIA	gkmiptvveildkfnhyesiepgdlift	GYGG	80									
gi 29893483	37		QIIAIYKGGIGKSTFTLANLSYMMA	qqGKKVLLIGCDPKSDTTSLLF	ggkatptiietsakkklageavqigdvcf	KRDG	116									
gi 46192678	36		QVIAIYKGGIGKSTFTLANLSYMMA	qiGKRVLVLLIGCDPKSDTTSLLF	ggkacptiietsarkklageevqigdvcf	KRDG	115									
			90		100		110		120		130		140		150	160
			*		*		*		*		*		*		*	*
Feature 1									# ##							
INIP_A	83		VKCVESGGPEPGVGCAGRG	vitainfleeegayeddLDFVFYDVLGDV	VVCGGFAMP	IrenkAQEIYIVCSGEMMAMYAAN	162									
gi 114867	116		VFAMELGGPEVGRGCGGRG	iihgfelleklgfhhdwFDFVLLDFLGDV	VVCGGFGLP	IardmAQKVIVIGSNDLQSLYVAN	195									
gi 21263466	81		VDCVEAGGPPAGAGCGGYV	vgetvkll-kelnafdeYDVILFDVLGDV	VVCGGFAAPLn--yADYCMIVTDNGFDALFAAN	157										
gi 34494831	81		VDCVEAGGPPAGAGCGGYV	vgetvkll-kelnafyeYDIILFDVLGDV	VVCGGFAAPLn--yADYCIITDNGFDALFAAN	157										
gi 1705819	81		VDCVEAGGPPAGAGCGGYV	vgetvkll-kelnafdeYDIILFDVLGDV	VVCGGFAAPLn--yADYCLITDNGFDALFAAN	157										
gi 33090219	81		VDSVEAGGPPAGAGCGGYV	vgetvkll-kelnafyeYDVILFDVLGDV	VVCGGFAAPLn--yADYCLIVTDNGFDALFAAN	157										
gi 510966	81		VDCVEAGGPPAGAGCGGYV	vgetvkll-kelnafyeYDVILFDVLGDV	VVCGGFAAPLn--yADYCLIVTDNGFDALFAAN	157										
gi 13878359	81		VDVETGGPPAGSGCGGYV	vgetvkll-ekmdvmarYDVILFDVLGDV	VVCGGFATPLq--yADLACVVSNDNFALFAAN	157										
gi 29893483	117		VFAMELGGPEVGRGCGGRG	iihgfetleklgfhhdwFDYVLLDFLGDV	VVCGGFGLP	IardmCQKVIVVGSNDLQSLYVAN	196									
gi 46192678	116		VFAMELGGPEVGRGCGGRG	iihgfelleklgfhhdwFDYVLLDFLGDV	VVCGGFGLP	IardmAQKVILVGSNDLQSLYVTN	195									
			170		180		190		200		210					
			*		*		*		*		*					
Feature 1																
INIP_A	163		NISKGIVKYAnsg-svRLGGLICNS	rntdredELIIALANKLGTQMIHFVPRD	214											
gi 114867	196		NVCNAVEYFRklggnvGVAGIVINK	dd--gtGEAQAFAREVGIPIILAAIPAD	245											
gi 21263466	158		RIAASVREKArth-plRLAGLIGNR	ts---krDLIEKYVEAVPMPVLEVLPLI	206											
gi 34494831	158		RIAASVREKArth-plRLAGLVGNR	ts---krDLIDKYVEACPMPVLEVLPLI	206											
gi 1705819	158		RIAASVREKArth-slRLAGLVGNR	td---krDLIDKYIDCVMPVLEVLPLI	206											
gi 33090219	158		RIVASVREKskth-plRLAGLIGNR	ts---krDLIDKYVEVCPMPVLEVLPLI	206											
gi 510966	158		RIAASVREKArth-plRLAGLIGNR	ts---krDLIDKYVEACPMPVLEVLPLI	206											

[gi_13878359](#) 158 RICE SVVEKNmsgydvKMAGVIGNRcd---qvDLLETFTRRIETPLMGVVPRK 207
[gi_29893483](#) 197 NVCN AVEYFRklggnvGVAGMVINKdd---gtGEAQAFAAHAGIPVLAaipan 246
[gi_46192678](#) 196 NVCSAVEYFRklggnvGVAGLVINKdd---gtGEAKAFAEAADIPILATIPAD 245

Allineamento nucleotidico di tutte le sequenze depositate in NCBI e EMBL corrispondenti al frammento amplificato via PCR per un totale di 5000 sequenze allineate.



Allegato 5 – Banca dati per analisi di sequenza e per la costruzione delle mappe di restrizione per il frammento amo.

Allineamento aminoacidico del gene *Ammonia monoxygenase (amo)*

```

70          80          90          100          110          120          130          140
...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|
1YEW_J      2
SAAQSAVRSHAEAVQVSRITIDWMALFVFFVIVGSYHIHAMLTMGDWDFWSDWKDRRLWVTVPIVLVTFPAAVQSYLWE
81
gi 75340284  2
SALTSAVRTPEEAKVFRTLDFIALGAFFMILLASHHVVMLMGDWDFWVDWKDRRFVWTVVPIVSVAYPAAAQAFFWE
81
gi 75348397  5
DEILKAAKMPPEAVKMSRMIDVIYFPILCILVGTYHMFLLAGDWDFWLDWKDRQWPVVTPIVGITYCAAIMYLWV
84
gi 122484316  2
SASQSAVRSRAEAVKVSRITIDYMILFTAFFVVLGGYHIHYMLTGGDWDFWTDWKDRRLWVTVAPIVSITFPAAVQAVLWW
81
gi 75368943  9
SPTGKTWKSKEEFLGCVILTDWILLVILFAVLLGSFHIHYMLLAGDWDFWIDFKDRRMWPTVTPIVAMCFAAAAQSFFWT
88
3CHX_B      7
GGAIGPFHSVAEAAGCVKTTDWMFLTLLFLAVLGYHIHFMLTAGDWDFWVDWKDRRMWPTVVPILGVTFAAAAQAFFWE
86
gi 122549220  43
AAAASPFHSRAEAAGAVRTADLLILTFLFLIMIGGYHVHAMLTMGDWDFWVDWKDRRMWPTVLPIMLVTFPAAAQYFFWE
122
gi 122549175  50
AAAGSPFNSKAEAAGLVKTADILLASLFLITLGYHIHAMLTMGDWDFWIDWKDRRFWPTVLPIVLVTFPAAAQAYFWE
129

150          160          170          180          190          200          210          220
...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|
1YEW_J      82
RYRLPFGATVCVLGLLLGEWINRYFNFWGWTYFPINFVFPASLVPGAIILDTVLMLSGSYLFTAIVGAMGWGLIFYPGNW
161
gi 75340284  82
KFRLPFGATLVTLGVLAGEWANRYFNFVGFTYFPINFVWPTILLPMALFLDAMLAISKSYGLTAVVGLMYGLLMYPANW
161
gi 75348397  85
NYRLPFGATLCIVCLLVGEWLTRFWGFYWWSHYPMNFVFPSTMIPGALVMDTVLLLTRNWMITALVGGAFGLLFYPGNW
164
gi 122484316  82
RYRIAWGATLCVLGLLLGEWINRYFNFWGWTYFPVNFVFPSNLMPGAIVLDVILMLSNSMTLTAVVGLAWGLLFYPGNW
161
gi 75368943  89
RFRLPIGATTVVLALLIGEWINRYDNFWGWTFFPINLVFPSALIPMGFWLDIVLMISGSWLVTALLGGLGWGLLFYPINW
168
3CHX_B      87
NFKLPFGATFAVSGLLIGEWINRYCNFWGWTYFPISLVFPSALVVPALWLDIIMLLSGSYVITAVVGSLGWGLLFYPNNW
166
gi 122549220  123
HFRLPFGATFLCVALLLFGEWLDRYISFWGWTYPINLVWPTSLVPQALFLDIVLLLSKSFIVTAIVGSMGFSLLLYPNNW
202
gi 122549175  130
SFRLPFGATFLVLGLLLFGEWVNRYTNFWGWTYFPISLVWPTSLVPAALFLDIVLLLSRSFIVTAIVGAMGWGLLLYPSNW
209

```

170 180 190 200 210 220

230 240

.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|

[1YEW_J](#) 162
 PIIAPLHVPVEYNGMLMSIADIQGYNYVRTGTPEYIRMVEKGTLLRTFGKDVAPVSAFFSAFMSILYFMWHFIGRWFSNE
 241

[gi 75340284](#) 162
 PLLSAFHVPAEYNGVVMSLADIMGYQYVRTGTPEYIRMVEKGTLLKTFGKDVVPVSAFFSGFVAMVMYFVWHFVGRWFSKD
 241

[gi 75348397](#) 165
 TIFGPTHLP LVAEGVLLSVADYTGFLYVRTGTPEYVRLIEQGLRRTFGGHTTVIASFFSAFVSMLMFTVWVYFGKVYCTA
 244

[gi 122484316](#) 162
 PIIAPLHVPVEYNGMMMTLADLQGYHYVRTGTPEYIRMVEKGTLLRTFGKDVAPVSAFFSGFVSILYFLWHFFGSWFGSE
 241

[gi 75368943](#) 169
 PVLAQYHQAAEIDGVLLTLADLIGFNYVRTGTPEYIRMVERGTLRTFGKDVVPVAAFFSGFISMLVYFLWNNMGKWFSTT
 248

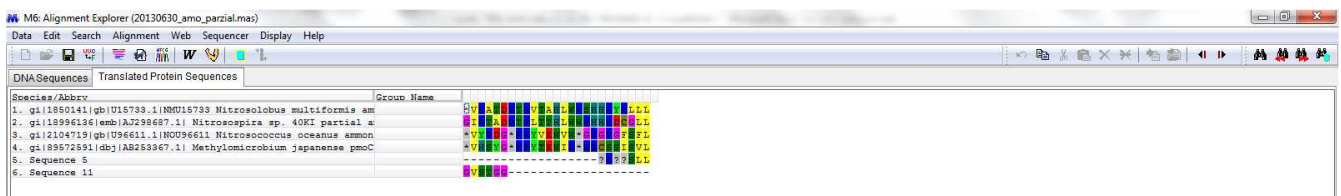
[3CHX_B](#) 167
 PAIAALHQATEQHGQLMSLADLVGFHFVRTSMPEYIRMVERGTLRTFGKEVVPVAAFFSGFVSMVMYFLWVFGKWYSTT
 246

[gi 122549220](#) 203
 VILAQFHQPT EQYGTLM SLADVIGFHNVRTSMPEYIRI IERGMRTFGKDVGVAAFFSGFVSIIVYFVWVYVGKMFSTT
 282

[gi 122549175](#) 210
 PILAPYHQATEQYGLLMSLADLIGFEYVRTSMPEYLRIVERGTMRTFGKDVVAVAAFFSGFVSILVYFVWVYVGKLFSTV
 289

.....*.
[1YEW_J](#) 242 -RFLQS 246
[gi 75340284](#) 242 -YHINQ 246
[gi 75348397](#) 245 fYYVKG 250
[gi 122484316](#) 242 -KFVQG 246
[gi 75368943](#) 249 -KYLEI 253
[3CHX_B](#) 247 -KVIQK 251
[gi 122549220](#) 283 -KYMKS 287
[gi 122549175](#) 290 -AYTKE 294

Allienamento aminoacidico di tutte le sequenze depositate in NCBI e EMBL corrispondenti al frammento amplificato *via* PCR per un totale di 500 sequenze allineate.



Allienamento nucleotidico di tutte le sequenze depositate in NCBI e EMBL corrispondenti al frammento amplificato *via* PCR per un totale di 500 sequenze allineate.