



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE

Tesi di Laurea

Analisi della diversità microbica di suoli di praterie montane

Relatore:

Professore Enrico Sturaro

Correlatore:

Prof. Andrea Squartini

Dott. Salvatore Raniolo

Laureando

Raffaele Zane

Anno Accademico 2021/2022

Abstract

L'obiettivo di questa tesi consiste nel valutare le relazioni tra il pascolamento e l'attività microbica, connessa al ciclo dell'azoto, nelle praterie montane del Parco Naturale di Paneveggio – Pale di San Martino.

Sfruttando la metodologia realtime-PCR, sono state analizzate la presenza e la variabilità dei geni coinvolti in questo ciclo: il gene *amoA*, nella variante Archaea e Bacteria, per quanto riguarda la nitrificazione, e il gene *nosZ* per quanto concerne la denitrificazione. Questi sono geni che attivano le funzioni ecosistemiche del suolo, generando un equilibrio nel ciclo dei nutrienti, pertanto la loro presenza e variabilità sono garanzia di un suolo vitale.

Le praterie ad alta quota, dove sono stati prelevati i campioni per le analisi, sono ambienti montani molto importanti sia a livello produttivo ma soprattutto a livello ecologico. È proprio al fine di salvaguardare queste fragili e preziose realtà che si è approfondito l'effetto degli animali al pascolo sulla qualità del suolo: in particolar modo sulla sua capacità di garantire condizioni favorevoli alla vita, assicurando un equilibrio tra le varie specie di azoto presenti nel suolo.

The main purpose of this thesis is assessing the relationships between grazing and the microbial activity – involved in the nitrogen cycle - in the mountain grassland of Parco Naturale di Paneveggio – Pale di San Martino.

Using the realtime-PCR method, the presence and the variety of the genes involved in the nitrogen cycle were analyzed. Specifically, the *amoA* gene, in the variants of Archaea and Bacteria, for the nitrification and the *nosZ* gene for the denitrification. These genes activate the ecosystem functions of the soil generating a balance between the nutrient cycle; their presence and variety are proof that the soil is a living one.

The high-altitude grasslands, where the samples for this analysis were taken, are mountain habitats very important from a production point of view but also for an ecologic one. It is precisely to protect these fragile and precious environments that the grazing impact on the quality of the soil was thoroughly analyzed. In particular, the analysis concentrated on the grazing ability to provide life-prone soil qualities, guaranteeing a balance between the different nitrogen species present in the soil.

Indice

1	Introduzione	7
1.1	I servizi ecosistemici	7
1.2	Il ciclo dell'azoto	9
1.2.1	Azotofissazione	10
1.2.2	Nitrificazione	10
1.2.3	Denitrificazione	11
1.2.4	ANAMMOX	11
1.2.5	Ammonificazione / Mineralizzazione	11
1.3	L'importanza dell'azoto nella biologia animale e vegetale	11
1.4	La comunità microbica nel suolo	13
1.5	Relazione tra pascolo e composizione della comunità microbica	15
2	Obiettivo	17
3	Materiali e metodi	19
3.1	I siti di indagine	19
3.1.1	Il Parco Naturale di Paneveggio	19
3.1.2	Le malghe: Juribello, Vallazza e Venegiota	20
3.2	Modalità di campionamento	21
3.3	Estrazione, purificazione e amplificazione del DNA	22
3.4	Analisi statistica	25
4	Risultati e discussione	27
5	Conclusioni	35
6	Bibliografia	37
7	Allegati	39
7.1	Allegato 1	39
7.2	Allegato 2	41
7.3	Allegato 3	42

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I servizi ecosistemici

Per mettere meglio a fuoco il concetto di servizio ecosistemico è necessario prima definire che cosa s'intenda per ecosistema.

La parola “ecosistema” deriva dalla fusione di “*Ekos*”, che in greco significa “casa” e sta ad indicare l'insieme degli organismi che vivono in una data area, e della parola “sistema”, che invece identifica i vari legami che vi sono tra i componenti dell'ecosistema.

Questo termine esprime quindi un insieme di interazioni tra la componente biotica, ovvero quella vivente, e quella abiotica, cioè quella non vivente.

La componente biotica è composta da tutti gli organismi viventi che si trovano all'interno dell'ecosistema; in particolare gli organismi appartenenti ad una singola specie vengono definiti “popolazione” e tutte le popolazioni che vivono all'interno dell'ecosistema costituiscono la “comunità”.

La componente abiotica invece comprende tutti quei fattori non viventi che definiscono l'ambiente, come ad esempio l'atmosfera, l'acqua, il clima etc. Il concetto di ecosistema è quindi sintetizzabile come la comunità degli organismi che ci vivono e l'ambiente che li circonda. (Carpaneto, 2008)

Ogni singolo componente di un ecosistema ha un ruolo importante all'interno di esso ed in base a ciò lo caratterizza. Questo concetto vale sia per le componenti biotiche sia per quelle abiotiche. L'inclinazione dei raggi solari, l'eventuale presenza di grandi laghi o di oceani, l'altitudine, etc sono tutti fattori abiotici che modificano l'ecosistema determinandone alcune caratteristiche e influenzando in questo modo la biodiversità e l'abbondanza della componente biotica.

Gli esseri viventi, dal canto loro, incidono notevolmente sull'ecosistema modificandolo direttamente con processi degradativi mediati dai microrganismi, oppure generando nuova biomassa, come nel caso degli organismi autotrofi o produttori primari.

A rendere ancor più complesso ed affascinante il concetto di ecosistema contribuisce il fatto che esso è definito come un sistema aperto, all'interno del quale vi sono diverse vie di flusso.

Una prima via di flusso è rappresentata dall'arrivo di nuovi organismi, come ad esempio migrazioni oppure particolari dinamiche di popolazione, e dall'eventuale uscita di altri organismi dal sistema considerato.

Altre vie di flusso che coinvolgono l'ecosistema sono il flusso energetico ed il riciclo di materia: questi sono rappresentati dall'insieme di reazioni chimico-fisiche che riguardano la sequenza di degradazione e assimilazione delle varie sostanze che liberano o necessitano energia. Inoltre, i flussi energetici e di materia dipendono in gran parte dai rapporti trofici che vi sono all'interno della comunità, ovvero dall'insieme di interazioni che avvengono tra produttori primari, o autotrofi (organismi che sintetizzano molecole organiche sfruttando energia che viene dal mondo inorganico), e consumatori, o eterotrofi (coloro i quali dipendono dalle molecole che sono state sintetizzate dagli autotrofi). Gli eterotrofi

possono essere divisi in consumatori primari, consumatori secondari, consumatori terziari e così via, in base all'organismo oggetto di nutrimento (consumatori primari se mangiano organismi autotrofi, consumatori secondari se mangiano consumatori primari etc).

Inoltre, altro aspetto da tener presente è che l'ecosistema varia molto in base alla scala considerata: un ecosistema può essere rappresentato da un intero deserto caratterizzato da peculiarità climatiche e biotiche, come da una piccola porzione di suolo che sta sotto ad una roccia, anch'esso ugualmente dotato di proprietà identificative.

Per di più, l'ecosistema può essere stabile e perdurare nel tempo, come una foresta, oppure può essere temporaneo ed essere suscettibile ad eventi e/o variazioni climatiche e/o temporali, come ad esempio la carcassa di un animale.

È proprio grazie alle complesse interazioni che vi sono tra le componenti biotiche e quelle abiotiche che si originano gli ecosystem services (ES).

Le funzioni ecosistemiche sono state definite e catalogate nel 2005 dal MEA (Millennium Ecosystem Assessment). Il MEA è un progetto di ricerca internazionale iniziato nel 2001 e conclusosi nel 2005 nato con lo scopo di “valutare le conseguenze dei cambiamenti dell'ecosistema per il benessere umano e per stabilire con basi scientifiche le azioni necessarie per migliorare la conservazione e la sostenibilità d'uso degli ecosistemi e dei loro contributi al benessere umano.” (Reid et al. 2005)

Questo progetto di fondamentale importanza definisce le funzioni ecosistemiche come “i benefici che le persone ottengono dagli ecosistemi”.

In particolar modo, il MEA suddivide i servizi ecosistemici in 4 grandi categorie:

- servizi di approvvigionamento; riguardano i beni di consumo, come ad esempio la produzione di cibo, l'acqua potabile, i combustibili naturali etc
- servizi di regolazione; riguardano ad esempio la variazione del clima e delle maree, la depurazione dell'acqua, la fertilità dei suoli etc
- servizi culturali; riguardano gli aspetti estetici dell'ecosistema, le attività educative e spirituali annesse e le varie attività ricreative
- servizi di supporto; ne è un esempio la formazione dei suoli, il ciclo dei nutrienti, la produzione primaria etc che sono quindi fondamentali per la sussistenza di tutti gli altri ES

Da questo elenco sommario dei molteplici servizi ecosistemici che vengono forniti continuamente e gratuitamente all'uomo dal mondo naturale, è evidente quanto questi siano fondamentali per il benessere dell'umanità.

Spesso, l'importanza che viene loro attribuita è considerata in modo marginale in quanto gli ES esulano dalle normali politiche di mercato.

Due secoli fa, Adam Smith affermava che le transizioni volontarie tra due parti avvengono soltanto quando recano benefici ad ambedue le parti coinvolte e che in ogni scambio queste hanno l'aspettativa di migliorare la propria condizione. Alla “teoria della transizione volontaria” appena citata è importante aggiungere un altro concetto: si dà per assodato infatti che i costi e i benefici del libero scambio siano accettati da entrambe le parti ma in alcuni casi accade che i costi siano in realtà un onere sostenuto da soggetti esterni e non direttamente coinvolti. Questi costi si chiamano appunto esternalità. (ANMS, 2011)

È in questa categoria di costi che spesso rientrano quelli a carico dell'ambiente: uno o più soggetti si avvantaggiano di uno scambio durante il quale viene recato un danno all'ecosistema ambientale.

« Siccome i servizi ecosistemici non vengono ‘catturati’ dai mercati e non vengono quantificati in termini comparabili con i servizi economici ed i prodotti industriali, molto spesso questi servizi non vengono neanche considerati nelle decisioni politiche » (Costanza et al., 1997)

A questo fine, il 15 maggio 1997 Robert Costanza pubblicò un articolo su *Nature* intitolato "The value of the world's ecosystem services and natural capital" nel quale, considerando 17 servizi ecosistemici per 16 biomi, stimò il loro valore economico sulla base di studi precedenti.

Tramite questa stima si è arrivati ad una cifra che quantifica il valore dei servizi ecosistemici per l'intera biosfera, ovvero 33 trilioni di dollari statunitensi l'anno. (Costanza et al., 1997)

La quantità e la qualità dei servizi ecosistemici forniti da un ecosistema dipende sostanzialmente dal suo stato di salute e di resilienza. Questo implica quindi una correlazione con la gestione dell'ecosistema: nel momento in cui coloro i quali gestiscono l'ecosistema godono direttamente dei vantaggi che esso fornisce, come ad esempio nel caso dell'agricoltura, questi riescono a tutelarla in maniera adeguata. Quando invece i vantaggi forniti dall'ecosistema sono a beneficio della collettività, come ad esempio nel caso della depurazione dell'acqua, della fertilità dei suoli, etc, gli interessi di chi gestisce la risorsa possono non essere convergenti con quelli di coloro i quali ne beneficiano. Questa discordanza associata al problema delle esternalità, porta spesso ad una gestione non sostenibile e consapevole degli ecosistemi.

«We use nature because it is valuable, we lose nature because it is free». (Ed Barbier, Ed Barbier, membro dell'Advisory Board di TEEB)

1.2 Il ciclo dell'azoto

Una delle funzioni ecosistemiche fondamentale alla vita è proprio il ciclo dei nutrienti, che fa parte della famiglia delle "funzioni di supporto".

Un ciclo biogeochimico indica la circolazione di un elemento chimico all'interno dell'ecosfera. I principali cicli biogeochimici sono quelli che riguardano il carbonio, l'ossigeno, il fosforo e appunto l'azoto.

I cicli biogeochimici possono essere inoltre considerati in base a diverse scale: una scala locale, che considera un piccolo ecosistema come ad esempio una pozzanghera (in questo caso molti degli apporti e delle perdite che in genere vengono considerati in grande scala possono essere trascurati), e su grande scala, considerando un grande ecosistema, come ad esempio una foresta. In quest'ultimo caso è opportuno approfondire i vari meccanismi nei quali è coinvolto l'elemento chimico in esame all'interno dell'area.

Infine, per comprendere al meglio le dinamiche di un elemento chimico nel pianeta e osservare nel complesso i suoi movimenti, è appropriato considerare il suo ciclo biogeochimico in scala globale; in questo caso, ancora di più rispetto a quanto accade nel ciclo a grande scala, bisogna considerare ogni movimento che l'elemento in esame compie ed ogni reazione nella quale è coinvolto.

Per ciascun ciclo biogeochimico può essere identificato:

- un pool di riserva, ovvero la zona in cui si trova la maggior percentuale dell'elemento chimico
- un pool di scambio, cioè una porzione ridotta rispetto all'intero ciclo ma la più dinamica, che comprende gli organismi e l'ambiente più immediato.

Il maggior pool di riserva dell'azoto si trova all'interno delle rocce ma sostanzialmente è azoto inutilizzabile, la maggior riserva utilizzabile invece è nell'atmosfera: con una percentuale del 78%, la forma principale in cui l'azoto si presenta è quella molecolare (N_2). In questa forma però è largamente inaccessibile alla maggior parte degli organismi, ad eccezione di coloro i quali sono in grado di compiere la fissazione biologica.

L'azoto molecolare è formato da un triplo legame ed ha un'energia di attivazione molto alta. L'enzima in grado di scindere il triplo legame dell'azoto molecolare è la nitrogenasi, posseduto solamente da pochi organismi, gli azoto-fissatori. Solo questo genere di organismi sono quindi in grado di scindere il triplo legame attuando il processo che viene chiamato "fissazione".

Le trasformazioni più importanti nel ciclo dell'azoto sono la fissazione, la nitrificazione, la denitrificazione, l'anammox e l'ammonificazione. La trasformazione dell'azoto in vari stati di ossidazione è la chiave della produttività nella biosfera e dipende molto dalle attività dei diversi microrganismi, come Bacteria e Archaea, e dai funghi. (Bernard, 2010)

Il ciclo biogeochimico dell'azoto si divide in 5 fasi:

1.2.1 Azotofissazione

Il pool di riserva è l'azoto atmosferico.

La fissazione dell'azoto può avvenire tramite: fissazione non biologica, fissazione biologica e fissazione industriale.

La fissazione non biologica si verifica nel momento in cui le molecole di N_2 vengono rotte da fonti di energia naturale, ovvero i fulmini. Un fulmine sprigiona una grande quantità di energia in grado di scindere il triplo legame tra i due atomi di azoto che compongono la molecola, questo permette la successiva formazione degli ossidi di azoto nel momento in cui l'atomo di azoto reagisce con l'ossigeno, anch'esso presente in atmosfera (in una percentuale del 21%).

Gli ossidi di azoto, NO e N_2O , possono poi combinarsi con l'acqua della pioggia e cadere sulla superficie terrestre sotto forma di nitrati, NO_3 , disponibili quindi per le piante.

La fissazione industriale sfrutta il processo "Haber-Bosch". Questo consiste nella sintesi di ammoniaca a partire da azoto molecolare e idrogeno gassoso secondo la seguente reazione chimica:



Questa reazione necessita però di condizioni molto dispendiose di energia: il processo deve essere eseguito ad una pressione di 200 bar e ad una temperatura compresa tra 500 °C e 600 °C. (Ribeiro, 2013) È una metodologia utilizzata per sintetizzare fertilizzanti azotati oppure per la realizzazione di esplosivi (durante la prima guerra mondiale sono stati sintetizzati nitrocomposti usati per la produzione di munizioni).

La fissazione biologica invece avviene a temperatura e pressione ambientale proprio grazie all'utilizzo di un catalizzatore specifico, la nitrogenasi. La nitrogenasi è un complesso enzimatico che scinde i due atomi di azoto della molecola N_2 secondo la reazione chimica qui descritta:



Essa necessita di condizioni riducenti per compiere la propria funzione, a questo fine diversi organismi attuano strategie differenti: l'*azotobacter*, un batterio azotofissatore libero, che vive nel suolo senza essere in rapporti simbiotici con piante o altri organismi, respira molto velocemente riducendo in questo modo l'ossigeno in anidride carbonica ed acqua. Un'altra strategia è quella attuata dai microrganismi simbiotici, i quali sono confinati all'interno di noduli radicali entro i quali è mantenuta una condizione riducente. Altri batteri vivono in ambienti dove vi sono già condizioni riducenti, come ad esempio le zone sott'acqua.

1.2.2 Nitrificazione

La nitrificazione è un processo che porta alla conversione di ammoniaca in nitriti e successivamente in nitrati. Questo processo consiste in una successione di due reazioni di ossidazione attuate da microrganismi nitrificanti con metabolismo chemiolitotrofico, i quali ricavano energia dalla reazione di ossidazione.

La prima reazione di ossidazione dall'ammoniaca al nitrito è mediata da microrganismi chiamati "ammonia - oxidizers"; questi microrganismi sono autotrofi che producono carbonio organico partendo dalla fissazione della CO_2 , meccanismo analogo alla fotosintesi ma che sfrutta l'ammoniaca come fonte di energia invece che i raggi solari.

Il secondo step della nitrificazione è la reazione di ossidazione del nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-). Questo passaggio è mediato da microrganismi differenti, chiamati “*nitrite-oxidizing Bacteria*”, come ad esempio i *Nitrobacters*.



1.2.3 Denitrificazione

La denitrificazione è l’insieme di reazioni che hanno come prodotto ultimo l’azoto molecolare gassoso.

In particolare, essa si può definire come una sequenza di reazioni di ossidazione che avvengono per mediazione di batteri eterotrofi facoltativi. Questi batteri necessitano quindi di sostanza organica come fonte di carbonio e, in condizioni di anaerobiosi (carenza di ossigeno), possono utilizzare il nitrato o le altre forme di ossidi di azoto NOx come accettore ultimo di elettroni nella loro respirazione anaerobia, provocandone la riduzione.

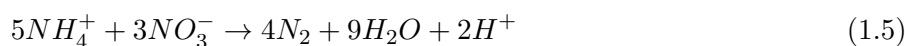


Questa reazione tuttavia nasconde rischi e risvolti ambientali negativi: nonostante sembri portare alla formazione di azoto molecolare (un gas inerte ed innocuo per l’ambiente) a partire da composti potenzialmente inquinanti come nitriti e nitrati (che possono dar luogo ad esempio a fenomeni di eutrofizzazione), in realtà il potenziale problema sta nella formazione di stadi intermedi quali l’ossido nitroso N_2O . Questo infatti è un gas serra con un global warming potential (GWP) molto elevato, 310 volte maggiore di quello della CO_2 , e rappresenta il 6–8% dell’attuale riscaldamento globale. (Ali et al. 2012)

1.2.4 ANAMMOX

L’acronimo ANAMMOX sta per “anaerobic ammonia oxidation”, ovvero l’ossidazione dell’ammonio in condizioni di anaerobiosi. In presenza di poco ossigeno, come ad esempio in un terreno saturo d’acqua, la nitrificazione viene soppressa e si accumula quindi ammoniaca.

È in tale contesto che può verificarsi l’ossidazione anaerobia dell’ammonio che segue la seguente stechiometria:



1.2.5 Ammonificazione / Mineralizzazione

L’ammonificazione è il processo tramite il quale l’azoto organico presente nei tessuti di organismi morti o nelle loro deiezioni viene degradato in ammoniaca (NH_3).

Specialmente nei suoli acidi, nel momento in cui l’ammoniaca viene in contatto con gli ioni H_3O^+ avviene una reazione spontanea con formazione di ammonio, NH_4^+ . L’ammonio è una delle forme di azoto che sono assimilabili dalle piante.

Nel caso invece di suoli basici o neutri, dove non si ha la formazione dello ione ammonio, l’ammoniaca risulta molto volatile e tende quindi a liberarsi in atmosfera dove svolge un ruolo molto importante per contrastare il fenomeno delle piogge acide, agendo appunto come base.

1.3 L’importanza dell’azoto nella biologia animale e vegetale

L’azoto è un elemento fondamentale per la vita in quanto contribuisce a formare molecole fondamentali quali DNA, proteine e vitamine. Viene analizzato di seguito dove si trova questo elemento nelle macromolecole.

- Il DNA, o acido desossiribonucleico, è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche utili per la sintesi dell'RNA, delle proteine e di altre molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento degli organismi viventi.

Gli acidi nucleici sono biopolimeri formati da nucleotidi legati insieme a formare una lunga catena. Ogni nucleotide è composto da un nucleoside legato ad un gruppo fosfato ed ogni nucleoside è composto da uno zucchero aldopentoso legato ad una base azotata. È a questo livello di dettaglio che si intuisce l'importanza dell'azoto, elemento costituente di ogni base azotata che forma un nucleoside.

- Le proteine sono macromolecole biologiche formate da una sequenza di amminoacidi legati tra loro da legami peptidici. Gli amminoacidi sono composti bifunzionali, nei quali è presente sia un gruppo amminico basico (NH_3), sia un gruppo carbossilico acido ($COOH$). L'azoto quindi, assieme al carbonio, all'ossigeno e all'idrogeno (e spesso anche allo zolfo), è uno degli elementi fondamentali alla costituzione degli amminoacidi, in particolare si trova nei gruppi amminici che li costituiscono.
- Le vitamine sono quelle sostanze organiche che un organismo non è in grado di sintetizzare ma che deve ottenere con il cibo, perché sono fondamentali in piccole quantità per poter vivere e crescere. Le vitamine sono inoltre necessarie per assicurare il corretto svolgimento delle funzioni metaboliche dell'organismo. Hanno composizione chimica molto variegata che non è riassumibile in una formula generale, in ogni caso anche in queste molecole uno degli elementi costituenti più comuni è proprio l'azoto.

L'azoto nel suolo è spesso un nutriente limitante per le piante, ovvero è un elemento indispensabile alla vita che spesso però si trova in concentrazioni troppo basse per consentire un corretto sviluppo della componente biotica, in particolar modo per la flora. Sono di grande importanza quindi le simbiosi che possono instaurarsi tra piante e azotofissatori.

Il termine simbiosi indica il vivere assieme di due organismi diversi. Si possono distinguere due tipi di simbiosi: le simbiosi parassitiche, in cui l'ospite subisce danni rilevanti fino ad arrivare alla morte, e le simbiosi mutualistiche, nelle quali entrambi i partner ricevono vantaggi dall'associazione.

Tra tutte le simbiosi, esiste una simbiosi mutualistica molto importante per quanto riguarda l'azoto: quella che si può instaurare tra alcuni eubatteri del genere *Rhizobium* e le radici di alcuni taxa della famiglia delle leguminose (come fagioli, piselli, trifoglio, soia ed altre ancora).

In condizioni di carenza di azoto disponibile nel suolo, una pianta della famiglia delle leguminose può rilasciare tramite le radici degli essudati radicali contenenti anche "stimolatori del nod-factor". (Buchanan et al. 2003) I batteri, attratti chemiostaticamente (seguono un gradiente di concentrazione chimico), raggiungono il pelo radicale; a questo punto l'espressione genica indotta dagli essudati radicali porta alla sintesi del nod-factor (o fattore di nodulazione) da parte dei batteri.

Il nod-factor è specie specifico per ogni leguminosa, ciò vuol dire che, affinché il processo di simbiosi continui, la pianta ospite deve appartenere ad una particolare specie, determinata dal fattore di nodulazione.

Se il nod-factor è riconosciuto dalla pianta, si hanno delle risposte biologiche: si verifica un cambiamento conformazionale del pelo radicale che cresce arricciandosi su sé stesso e avvolgendo i batteri nelle vicinanze, inoltre vi è un'estrusione di altri essudati radicali con stimolatori di nod-factor.

Contemporaneamente si verifica un'altra risposta nella pianta, che costituisce il "filamento di infezione": una sorta di condotto all'interno del pelo radicale attraverso il quale i batteri entrano nella radice e raggiungono la zona profonda corticale.

Le cellule profonde corticali (che si trovano nel cilindro centrale, la parte più interna del fusto e della radice), durante tutto il processo, continuano ad essere indotte alla divisione cellulare; ciò porta alla formazione del nodulo radicale che, a maturazione completata, fuoriesce dalla radice stessa.

I batteri penetrati nella pianta subiscono poi un differenziamento, aumentando fino a trenta volte la loro dimensione e diventando in grado di fissare l'azoto atmosferico; per indicare l'avvenimento di

queste modificazioni viene assegnato loro il termine di “batteroidi”.

All'interno delle cellule della pianta i batteroidi vengono avvolti da una membrana cellulare plasmatica, chiamata membrana peribatteroide, che li separa dal citoplasma e regola gli scambi tra la pianta e il *Rhizobium*. Entrando più nel dettaglio: la pianta fornisce al batteroide i fotosintati necessari per il suo metabolismo ed esso fornisce alla pianta azoto sotto forma di ammonio.

Per fissare l'azoto atmosferico i batteroidi utilizzano il complesso enzimatico della nitrogenasi, composto da azoferridossina, che contiene ferro, e molibdoferriidossina, che contiene molibdeno. La nitrogenasi è però molto sensibile all'ossigeno, dal quale può essere irreversibilmente inattivata. Nella simbiosi azotofissatrice questo rischio viene limitato in due modi: vi è deposizione di suberina nelle cellule più esterne del nodulo radicale che limita gli scambi gassosi e viene prodotta una proteina, la leghemoglobina, in grado di legare l'ossigeno all'interno dei noduli diminuendone la concentrazione.

Proprio grazie alla simbiosi appena descritta con i *Rhizobia*, le leguminose sono ricche di proteine. I loro semi hanno una percentuale di proteine che non è mai inferiore al 15% e può arrivare fino al 40%.

L'attitudine delle leguminose come miglioratrici del suolo viene sfruttata anche nelle pratiche agronomiche delle rotazioni colturali (dove le leguminose vengono coltivate per arricchire il terreno di azoto) e del sovescio, pratica che consiste nell'intralciamiento della coltivazione, che nel caso di leguminose arricchisce il suolo di azoto e sostanza organica.

1.4 La comunità microbica nel suolo

Sulla base delle conoscenze attualmente a disposizione, la vita sulla Terra si ipotizza sia comparsa subito dopo la formazione del Pianeta, stimata circa 4,6 miliardi di anni fa. Le prime forme di vita sulla Terra hanno lasciato tracce della loro presenza nelle rocce sedimentarie; le più antiche ritrovate risalgono a 3,5 miliardi di anni fa.

Altri studi che hanno come obiettivo ripercorrere a ritroso la storia filogenetica degli esseri viventi, presuppongono un'età di quasi 4,3 miliardi di anni per la comparsa dell'ultimo antenato comune universale (Last Universal Common Ancestor: LUCA). (Pearce et al. 2018)

Nonostante diverse teorie, è comunemente accettato che gli organismi ancestrali che popolavano la Terra fossero esseri unicellulari, con una struttura cellulare molto semplice e poco sviluppata: i procarioti (“*pro*” significa “prima”, indica che sono state le prime forme di vita, e “*carion*”, ciò che contiene materiale genetico).

Nel corso dell'evoluzione si è andati incontro ad una complessità crescente di strutture cellulari, portando anche ad un principio di differenziazioni funzionali.

Un importante tassello nell'evoluzione microbica risale a 2500 milioni di anni fa, quando l'evoluzione specifica di alcuni organismi procarioti li ha portati ad essere capaci di trasformare composti inorganici in composti organici: i cianobatteri sviluppano la fotosintesi clorofilliana.

Dalla comparsa di questo importante processo chimico iniziano ad apparire le prime forme di compartimentazione ed i primi organuli, racchiusi e delimitati da membrane.

L'ultima importante modifica evolutiva è l'immagazzinamento dell'informazione genetica all'interno di una membrana: si è costituito il nucleo cellulare.

In questi brevi passaggi sono quindi riassunte le principali tappe evolutive che hanno portato alla formazione della cellula eucariote.

Tra i due tipi di cellule ci sono quindi varie differenze.

La cellula procariote, oltre ad essere più piccola di quella eucariote (con un diametro di circa 0,2 – 2 micrometri), ha una struttura interna molto più semplice. Il DNA infatti si trova concentrato in una regione del citoplasma che non è delimitata da alcuna membrana; inoltre è priva di organuli (eccezion fatta per i ribosomi, anch'essi sparsi nel citoplasma).

La cellula eucariote invece è notevolmente più grande (ha un diametro compreso tra i 10 e i 50 micrometri) ma la differenza principale tra le due è data dalla presenza di organuli cellulari, ovvero strutture provviste di membrana che svolgono una particolare funzione. Inoltre, il materiale genetico è delimitato nel nucleo della cellula da una membrana.

Fatta questa prima differenziazione ci si può addentrare nel mondo della sistematica degli esseri viventi. Carl Woese nel 1990 propose una classificazione ancora in vigore che divide tutti gli organismi in 3 grandi domini: Bacteria (Batteri); Archaea (Archei); Eukarya (Eucarioti). (Woese et al. 1990)

Batteri e Archei sono organismi procarioti unicellulari mentre gli Eucarioti sono organismi pluricellulari.

Bacteria ed Archaea, pur costituendo due domini separati all'interno dei procarioti, condividono delle similitudini: innanzitutto hanno dimensioni molto simili, inoltre entrambi si riproducono esclusivamente tramite riproduzione asessuata e sono in grado di attuare il trasferimento genico orizzontale attraverso la trasformazione, la coniugazione e la trasduzione.

La trasformazione si verifica nel momento in cui il DNA si trova nell'ambiente esterno, ad esempio all'interno di plasmidi, ed entra in una cellula vivente incorporandosi al suo genoma.

La coniugazione consiste nell'incontro tra due cellule diverse che creano un ponte citoplasmatico (o pilo sessuale) tramite il quale avviene lo scambio di DNA o plasmidi.

La trasduzione prevede il passaggio di DNA tra due cellule diverse mediato da un virus.

Nonostante queste similitudini, vi sono varie differenze che rendono i Batteri e gli Archei appartenenti a due domini diversi.

Per quanto riguarda la parete cellulare, la differenza riguarda il tipo di molecola che la compone, ovvero il peptidoglicano per i Bacteria, e lo pseudo-peptidoglicano per gli Archaea.

Si differenziano inoltre anche per la membrana cellulare: nella membrana batterica (come in quella eucariotica) i fosfolipidi sono formati da una testa polare D-glicerolo-3-fosfato a cui seguono, tramite legame estere, due catene di acidi grassi. Negli Archaea invece il glicerolo è presente nella forma di L-glicerolo (con una diversa chiralità), legato da legame etere (diverso legame chimico) e due catene di isoprenoidi (diverse catene alifatiche, catene aperte di atomi di carbonio).

Inoltre, gli Archaea sono provvisti di introni: regioni di DNA non codificanti che consentono il processo dello splicing (parte del processo di trascrizione degli Eucarioti).

Archei, Batteri e funghi (che costituiscono uno dei 7 regni nei quale sono suddivisi gli Eukarya) costituiscono il microbiota del suolo e svolgono un ruolo fondamentale per il mantenimento della fertilità del suolo e della sua produttività.

La diversità della componente biotica nel suolo ha un ruolo fondamentale nella conservazione degli ecosistemi relativa a tutto l'insieme di processi nel quale essa è coinvolta. Una diversità batterica ridotta può causare una mancanza di ridondanza funzionale degli ecosistemi. Per ridondanza funzionale si intende la presenza di più specie che attuano una stessa funzione all'interno dell'ecosistema: più questa è ridotta più le funzioni ecosistemiche garantite dal buon funzionamento dell'ecosistema rischiano di essere danneggiate.

Per quanto riguarda il ciclo dell'azoto, esiste una sorprendente diversità di microrganismi tra Archaea e Bacteria coinvolti e ciascuno di questi ha precisi requisiti fisiologici per una crescita ottimale. Poiché le condizioni in natura sono molto variabili e raramente ottimali per garantire la crescita delle specie microbiche, il ricambio di azoto da parte dei singoli microrganismi è destinato ad essere inefficiente. (Kuypers et al. 2018) Tuttavia, le trasformazioni dell'azoto nell'ambiente sono effettuate da comunità microbiche che riciclano l'azoto complessivamente in modo più efficiente rispetto ai singoli microrganismi. Questo bilancio è garantito dall'efficienza di fissazione della comunità microbica che caratterizza sia la sfera globale che molti altri ecosistemi, come suoli forestali e vortici oceanici. (Kuypers et al. 2018)

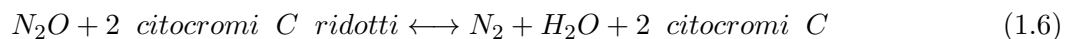
I processi di nitrificazione e denitrificazione vengono eseguiti da una complessa rete di microrganismi specialisti che sono tra loro in interazione di cooperazione e di competizione. Ad esempio, in diversi ambienti la nitrificazione è operata da differenti gruppi di microrganismi che sono in competizione per il nitrito o per l'ammoniaca, come nel caso di *Nitrospira* spp. e *Candidatus Brocadia* spp. che competono per il nitrito.

È possibile anche uno scenario nel quale competizione e cooperazione tra specie diverse coesistano: un esempio può essere il caso di *Nitrosopumilus* spp. che produce nitriti per *CaScalindua* spp., ma compete con quest'ultimo per l'ammoniaca. (Kuypers et al. 2018)

Concentrandosi ora sulla nitrificazione, questa è operata sia da Archei, *AOA* (*Ammonia-oxidizing Archaea*), sia da Batteri, *AOB* (*Ammonia-oxidizing Bacteria*), che utilizzano l'enzima Ammoniaca Monossigenasi (*AMO*), codificato da entrambi attraverso il gene *amoA*.

In termini di abbondanza relativa, gli Archaea sono più presenti in ambienti più difficili per la vita, come possono essere quelli oligotrofici o con scarso ossigeno; in ambienti ricchi di nutrienti invece prevalgono i Bacteria. La prevalenza numerica di un dominio piuttosto che dell'altro dipende più nello specifico da molteplici fattori ambientali, come la temperatura del suolo, il pH, la presenza di ossigeno e la disponibilità di nutrienti.

Per quanto riguarda la denitrificazione, un gene molto importante che codifica per l'enzima Ossido Nitroso-riduttasi è il *nosZ*. Più nel dettaglio l'enzima codificato partecipa all'ultimo passaggio della nitrificazione attraverso la seguente reazione:



Essendo una reazione che coinvolge il perossido di azoto molecolare (N_2O), l'enzima assume una grande importanza perché va a definire il suo potenziale di riduzione influenzando di conseguenza la presenza di una gas con un GWP estremamente elevato.

1.5 Relazione tra pascolo e composizione della comunità microbica

La prateria rappresenta uno degli ecosistemi più diffusi al mondo: copre una superficie di 3,5 miliardi di ettari ovvero circa il 26% della superficie terrestre e il 70% della superficie agricola. (Mencel et al. 2022) Oltre ad essere una fonte di nutrimento per gli animali ruminanti, le praterie hanno anche molte altre funzioni ecosistemiche che sono molto importanti per l'uomo. Svolgono ad esempio un ruolo chiave nelle seguenti dinamiche naturali: climatiche, idrologiche, di depurazione, fitosanitarie, etc. Sono inoltre rifugio per numerose specie rare e protette sia di piante sia di animali.

La ricchezza e la diversità della componente vegetale sono per lo più influenzate dalle condizioni dell'habitat, come il tipo di suolo, la disponibilità di nutrienti, l'umidità e la presenza di microrganismi. L'insieme dei microrganismi e della vegetazione determinano la natura e la direzione dei processi biochimici e fisico-chimici che si verificano nel suolo. Questi hanno inoltre una notevole influenza sulla fertilità del suolo, sul suo potenziale di resa e sulla resa delle colture.

Le interazioni che si verificano nel suolo tra la comunità microbica e la vegetazione sono alla base di varie funzioni ecosistemiche tra cui la circolazione dei nutrienti, il controllo di patogeni, l'infiltrazione dell'acqua e la formazione di catene trofiche.

Le praterie possono avere diversi utilizzi, uno dei più comuni è il pascolo, ovvero il riservare una superficie prativa per il nutrimento del bestiame. Più semplicemente, nel momento in cui una prateria è riservata a questo utilizzo, prende il nome di "pascolo".

Il pascolamento ha anche un'influenza significativa sul manto erboso delle praterie, qui infatti è dove animali e piante interagiscono: rimuovendo biomassa, gli animali non influenzano solamente la composizione delle specie che compongono la prateria ma anche le condizioni chimico-fisiche del suolo e le sue caratteristiche biologiche, andando di conseguenza a modificare l'habitat che ospita il microbiota.

Gli animali al pascolo, inoltre, lasciano i loro escrementi sul manto erboso, fornendo nutrienti come azoto, fosforo, potassio, calcio e magnesio. Ciò implica che una buona gestione del pascolo possa ridurre la necessità di fertilizzanti minerali. La concentrazione di animali in queste aree inoltre può potenzialmente alterare i cicli dei nutrienti. Il bestiame infatti è in grado di ridistribuire e concentrare le sostanze nutritive attraverso apporti di escrementi che sono spesso più facilmente decomponibili rispetto ai residui vegetali. In questo modo viene aumentato il tasso di scambio delle sostanze nutritive tra le specie di microrganismi nel suolo, le piante e gli animali e facendo ciò il pascolo risulta poter incrementare l'attività dei batteri nitrificanti e denitrificanti.

La pressione che gli zoccoli degli animali al pascolo esercitano nel suolo compatta il terreno, favorendo la formazione di un manto erboso denso ed elastico. D'altro canto però un eccessivo pascolamento porterebbe ad una smisurata compattazione del suolo e di conseguenza ne limiterebbe la capacità di ritenzione idrica e lo scambio gassoso (caratteristiche importanti per un suolo vitale). (Mencel et al. 2022)

Molti dei processi guidati dai microrganismi nei suoli possono inoltre essere influenzati dalle pratiche di gestione del territorio e dai cambiamenti che queste portano nella comunità vegetale e nella composizione del microbiota.

Nello studio di Lindsay, Colloff, Gibb e Wakelin, è stato dimostrato che le pratiche di gestione agricola a lungo termine hanno influenzato le proprietà del suolo sottostante, arrivando fino a livelli di C e N doppi rispetto al suolo di riferimento ed a concentrazioni di ammoniaca fino a cinque volte superiori rispetto alla condizione iniziale. (Lindsay et al. 2010)

L'attività enzimatica è un indicatore sensibile della funzione ecosistemica; mostra infatti quali cambiamenti avvengono nel suolo e riflette le tendenze dei cicli biogeochimici. Analizzando l'attività enzimatica è possibile determinare eventuali cambiamenti nella componente biotica e nelle proprietà chimico-fisiche dei suoli.

L'efficienza catalitica degli enzimi è influenzata dalle specie di microrganismi nel suolo, dalla temperatura, dal pH, dall'abbondanza di acqua e aria nel suolo e dal contenuto di composti minerali e organici. (Mencel et al. 2022)

Il pH del suolo risulta infatti essere un fattore importante che influenza la capacità di nitrificazione, mineralizzazione-ammonificazione e denitrificazione attraverso questa relazione: nel momento in cui il pH aumenta, aumenta anche l'abbondanza del gene coinvolto nel ciclo dell'azoto. Lo stesso gene *amoA* è correlato positivamente con il suolo. La nitrificazione inoltre può essere inibita a pH bassi a causa di una diminuzione dell'ammonio disponibile. (Lindsay et al. 2010)

La differenza nell'attività enzimatica può essere causata dal tipo di suolo e dalla composizione botanica. L'utilizzo di praterie come pascoli aumenta notevolmente l'attività enzimatica nel suolo. Nel suo studio, N. Herold osservò che la biomassa microbica e la sua struttura, allo stesso modo dell'attività enzimatica, dipendono notevolmente anche dai parametri del suolo oltre che dalla gestione delle praterie. (Mencel et al. 2022)

Le cause principali per il cambiamento della composizione del microbiota sono proprio l'intensità e la modalità d'uso dei pascoli. Un pascolamento leggero e la falciatura della prateria possono portare ad un incremento nella popolazione di microrganismi, mentre un pascolamento intensivo ha un'influenza negativa sulla loro abbondanza e biodiversità. (Mencel et al. 2022)

Al fine di conservare habitat importanti quali le praterie ed i pascoli, è quindi fondamentale considerare tra i fattori rilevanti anche la gestione di queste realtà. Solo così sarà possibile garantire buoni parametri del suolo, affinché possano prosperare le comunità microbiche e la flora locale. Queste a loro volta renderanno possibile trarre beneficio dall'insieme delle funzioni ecosistemiche che un pascolo in buona salute è in grado di garantire.

Capitolo 2

Obiettivo

Lo studio è finalizzato a ricercare una differenza nel potenziale genico della comunità microbica rispetto a determinati processi nell'ecosistema, in questo caso la nitrificazione e la denitrificazione.

In particolar modo sono stati utilizzati i geni *amoA*, nella variante Archaea e Bacteria, e il gene *nosZ* come indicatori per il potenziale di nitrificazione e denitrificazione dei siti campionati. Si sono successivamente analizzate le differenze negli indicatori in funzione del sito campionato, del periodo e della presenza o meno del pascolamento.

In questo modo è stato possibile trarre delle conclusioni su come il pascolamento vada ad influenzare il ciclo dell'azoto nei siti campionati, nel breve termine.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 I siti di indagine

3.1.1 Il Parco Naturale di Paneveggio

Il Parco Naturale di Paneveggio si trova nella parte orientale della regione Trentino-Alto Adige fino ai confini con la provincia di Belluno. Il Parco, considerato area protetta dal 1967, si estende su un territorio montano che oggi ha una superficie di circa 19.700 ettari, con un'altitudine compresa tra i 1500 m s.l.m. e i 2982 m s.l.m. (l'altitudine della vetta della Pala di San Martino).

Nel 2009 le Dolomiti furono dichiarate Patrimonio Mondiale dell'Umanità dell'UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) e con queste anche il Parco stesso che ne è compreso, acquistando così un'importanza anche nel panorama internazionale.

Gran parte della superficie del Parco è occupata da foreste, la più importante delle quali è la Foresta di Paneveggio. Essa si estende per circa 2700 ettari, nei quali la specie arborea prevalente è l'abete rosso (*Piceaabies*) che costituisce l'85% degli alberi della Foresta in una fascia compresa tra i 1500 m s.l.m e i 1900 m s.l.m.. In zone più elevate invece diventa più frequente la presenza del larice (*LarixDecidua*) e del pino cembro (*Pinuscembra*). (Ali et al. 2013)

Nel Parco Naturale di Paneveggio, alcune delle aree più rilevanti per la biodiversità sono i prati ed i pascoli. Per ciò che concerne le superfici montane mantenute a prato da sfalcio, queste sono per la maggior parte denominate "Habitat natura 2000", ciò significa che hanno una grande importanza per quanto riguarda la conservazione della biodiversità.

Come si legge dal sito del ministero per la transizione ecologica, "Natura 2000" è uno strumento della politica dell'Unione Europea istituito dalla Direttiva 92/43/CEE "Habitat", che ha lo scopo di tutelare gli ambienti naturali e alcune specie di flora e fauna minacciati o rari a livello comunitario. In questo senso si è creata una rete formata dai siti di importanza ecologica, la "Rete Natura 2000", che in sinergia con le attività antropiche locali garantisce protezione e conservazione alle aree di cui è composta. Ciò riguarda sia gli ambienti naturali sia gli habitat seminaturali come ad esempio le aree ad agricoltura, i pascoli, i prati da sfalcio etc.

Per quanto riguarda i pascoli invece, questi ad oggi costituiscono il 26% della superficie totale del Parco, ovvero 5152 ettari. La maggior parte di questa superficie è posta al disotto del limite della vegetazione arborea ed è pertanto di origine antropica: essa è il prodotto del mantenimento di queste aree da parte dell'uomo tramite il taglio di aree boschive, la semina di specie erbacee per il pascolo e per la produzione di foraggio e il pascolamento del bestiame.

Il bestiame e le zone di pascolo costituiscono una realtà molto importante in queste aree anche per quanto riguarda l'aspetto economico. L'economia agricola dei sette comuni che fanno parte del Parco Naturale di Paneveggio infatti è interamente legata alla zootecnia e al turismo.

All'interno del Parco vi sono 10 malghe tutt'ora produttive che basano la loro attività sulla produzione lattiero casearia, fondamentale tra i prodotti locali.

In questo settore però si osserva un trend negativo nel numero di capi allevati. Un possibile piano per evitare la progressiva diminuzione delle attività zootecniche locali è la coordinazione con il settore turistico. La realtà delle malghe, infatti, nel periodo estivo offre un servizio di tipo agroturistico e di supporto agli escursionisti. Questo processo di integrazione spiegato nel “Piano del Parco Naturale”, va però gestito al meglio al fine di evitare che il fragile settore zootecnico tradizionale venga sopraffatto dal turismo incontrollato. (Il Piano del Parco - Parco Naturale Paneveggio Pale di San Martino, 2016).

3.1.2 Le malghe: Juribello, Vallazza e Venegiota

Le tre malghe nelle quali sono stati prelevati i campioni oggetto di studio sono le malghe Juribello, Vallazza e Venegiota. Esse, situate all'interno del Parco Naturale di Paneveggio, e più precisamente nel comune di Primero San Martino di Castrozza, rispecchiano la tipica malga in contesto alpino: sono principalmente utilizzate per il pascolamento del bestiame e inoltre, soprattutto nel periodo estivo, rappresentano meta di importanti flussi turistici a cui vengono garantiti servizi di agriturismo con vendita di prodotti locali.

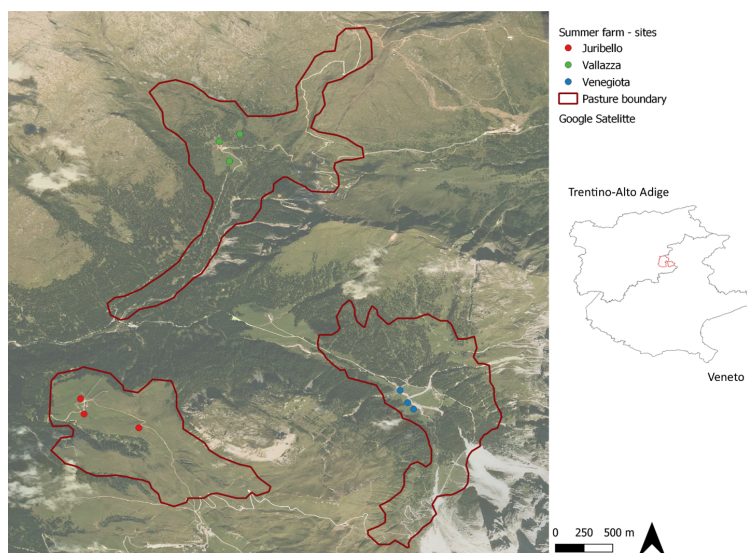


Figura 3.1: Mappa raffigurante la posizione delle malghe.

La malga Vallazza, a 1935 m s.l.m., è situata nei pressi della cima del Passo Valles, che segna il confine con la provincia di Belluno. Essa ha un' area di pascolo dichiarata di 150 ettari ed ospita 41 vacche e una decina di pecore. (Raniolo et al. 2019) In particolare, le vacche presenti appartengono alle razze Bruna e Grigio Alpina e il suolo è del tipo *Umbrisol*.

La malga Venegiota si trova ad un' altitudine di 1824 m s.l.m., nella Val Venegia, ai piedi delle Pale di San Martino. Nei suoi pascoli, caratterizzati da un suolo di tipo *Leptosol*, sono ospitate 78 vacche produttive di razza Bruna.

Infine, la malga Juribello, situata nei pressi di Passo Rolle a 1861 m s.l.m., è forse la malga più importante di tutto il Parco Naturale di Paneveggio. Essa ha un'origine storica di rilievo: i primi documenti la citano già nel 1284. Nel 1929 divenne “stazione razionale di alpeggio”, da quel momento diventò una sede estiva per la formazione di pastori e caseari. Questa funzione venne mantenuta anche quando nel 1961 la gestione passò alla Federazione Provinciale degli Allevatori di Trento, che la fece diventare un vero e proprio “punto di riferimento per la ricerca e la formazione nel settore dell'alpi-cultura”. (Pennesi et al. 2014)

La malga Juribello è una delle poche che ha resistito al cambiamento del paesaggio avvenuto negli ultimi decenni e continua ad essere una realtà fondamentale per la valorizzazione dei pascoli e delle malghe. Tutt'ora è una malga attiva che durante il periodo estivo ospita nei propri pascoli, dove il suolo è di tipo *Cambisol* e *Podzol*, fino a 150 vacche di razza Bruna e Pezzata Rossa.

3.2 Modalità di campionamento

Lo studio di questa tesi si basa sull'analisi del DNA ricavata da campioni di suolo prelevati nei pascoli delle malghe sopra citate, ovvero malga Vallazza, malga Venegiota e malga Juribello.

Il campionamento è stato eseguito in 4 periodi diversi, nelle seguenti giornate: 19/06/2019, 02/07/2019, 16/07/2019 e 23/08/2019.

Per ogni pascolo si sono scelti tre punti nei quali sono stati effettuati i prelievi, e in ogni punto sono stati prelevati sei campioni: tre interni ad una gabbia di esclusione e tre esterni. La gabbia di esclusione è uno strumento che non consente agli animali di pascolare nell'area in essa contenuta e permette perciò di avere un campione di riferimento per le aree non pascolate.



Figura 3.2: *Fotografia di una gabbia di esclusione utilizzata per il campionamento.*

Ciò significa che si sono ottenuti 6 campioni per sito campionato, ovvero 18 campioni per pascolo. Avendo campionato i 3 pascoli in 4 periodi diversi, i campioni totali a disposizione sono 216.

A questo punto si sono realizzati dei bulk con i campioni prelevati: un bulk è un insieme di campioni con caratteristiche comuni o accumulabili per altri motivi. In questo caso si sono formati accumulandoli per sito campionato, perciò se ne è formato uno con i campioni interni alla gabbia di esclusione e uno con quelli esterni, tutto ciò per ogni pascolo e periodo.

Ciò è stato fatto per limitare la variabilità riscontrata tra un metro e l'altro all'interno dello stesso sito campionato: ci sono molte variabili infatti che possono influenzare notevolmente le condizioni del suolo e la comunità microbica presente, come ad esempio il singolo zoccolo che va a calpestare il terreno compattandolo e modificandone la proporzione dei pori, i singoli apporti organici degli animali che modificano la quantità di azoto incrementando la disponibilità di nutrienti etc. Per tutti questi motivi si è preferito andare a lavorare con le medie e non con i singoli campioni per garantire una maggior rappresentatività del sito e di conseguenza incrementare la validità dello studio. Inoltre, la formazione dei bulk ha evitato il processamento di un alto numero di campioni, che sarebbe stato dispendioso sia a livello di tempo che di denaro.

Di conseguenza, il numero di campioni totali su cui si è basato lo studio risulta essere 72.

Per ciascun sito campionato sono state registrate le coordinate geografiche per mezzo dello strumento GPS “Garmin mod 73”.

Il processo di prelevamento consiste nella rimozione del cotico erboso e il successivo prelievo, attraverso l'utilizzo di un carotatore, del campione, corrispondente all'incirca ai primi 10 cm di suolo. I vari campioni sono stati quindi inseriti all'interno di provette falcon sigillate da 50 ml.

Fatto ciò, i campioni sono stati lasciati asciugare all'aria per una durata di due settimane (non si sono in ogni caso estratti dalle provette per evitare contaminazioni). A questo punto sono stati triturati per mezzo di un mortaio e setacciati con un setaccio da 500 micrometri. Dopo ogni campione gli strumenti utilizzati sono stati puliti con una soluzione di etanolo al 96% per evitare qualsiasi forma di contaminazione.

Questo processo riduce sensibilmente la tessitura del suolo aumentando la superficie specifica e incrementando l'efficacia dei vari reagenti. Inoltre, la pestellatura scompone la componente umica del suolo che può andare ad intralciare il processo di estrazione di DNA.

3.3 Estrazione, purificazione e amplificazione del DNA

Per l'estrazione del DNA è stato usato un kit di estrazione della Qiagen: il “DNeasy PowerSoil Pro Kit”, del cui protocollo sono allegati i vari passaggi. (ALLEGATO 1)

Sostanzialmente il suo funzionamento si basa su una sequenza di passaggi che prevedono l'utilizzo di molteplici reagenti e filtri, uno dei quali composto da silice che consente di trattenere il DNA. L'insieme di passaggi permette quindi l'estrazione e la purificazione chimica e meccanica del DNA dal campione di suolo.

Più in particolare, nei vari passaggi si è fatto reagire il suolo con diversi reagenti e ad ogni passaggio si è prelevata la soluzione surnatante dopo la centrifugazione e la si è collocata in una nuova provetta con il reagente successivo. I due passaggi fondamentali si sono verificati nel momento in cui, prima, si sono utilizzate provette con il filtro costituito da microbiglie in zirconio, utili per la lisi meccanica del suolo, poi, in un passaggio successivo, si sono utilizzate provette con un filtro in silice che hanno permesso di concentrare il DNA; qui infatti si ripete il passaggio due volte al fine di raccogliere nel filtro più DNA possibile. Come ultimo passaggio si inserisce un eluente che ha lo scopo di portare il DNA nel filtro in soluzione terminando così la procedura di estrazione e purificazione.

Al fine di quantificare i geni *amoA*, nella variante Bacteria e Archaea, e *nosZ*, è stata effettuata una realtime-PCR a partire dal DNA estratto e purificato attraverso il kit. Sono stati utilizzati di conseguenza tre diversi primers, ognuno dei quali presenta due forme complementari: la forma forward e quella reverse.

I primers utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

Primers	Funzioni	Sequenza
Archaeal <i>amoA</i> - AOA F	Ossidazione ammonio - nitrificazione	STAATGGTCTGGCTTAGACG
Archaeal <i>amoA</i> - AOA R	Ossidazione ammonio - nitrificazione	GCGGCCATCCATCTGTATGT
Bacterial <i>amoA</i> - AOB F	Ossidazione ammonio - nitrificazione	GGGGTTTCTACTGGTGGT
Bacterial <i>amoA</i> - AOB R	Ossidazione ammonio - nitrificazione	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
<i>nosZ</i> F	riduzione del protossido di azoto - denitrificazione	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG
<i>nosZ</i> R	riduzione del protossido di azoto - denitrificazione	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA

Tabella 3.1: *Elenco primers utilizzati per la PCR.*

Le lettere riportate in tabella corrispondono alle sigle delle quattro basi azotate: due pirimidiniche, citosina (C) e timina (T), e due puriniche, adenina (A) e guanina (G).

Le altre lettere indicano le possibili basi azotate presenti nella sequenza secondo la nomenclatura IUPAC: la lettera M corrisponde a A o C, la lettera N indica l'assenza di base, la R corrisponde a A o G, la S sta per G o C e la lettera Y invece per C o T.

Per ottenere un'elevata riproducibilità dello studio sono state effettuate tre repliche tecniche per ogni campione.

Per ogni replica sono state utilizzate delle piastre da 384 pozzetti. In ogni piastra, 3 pozzetti sono stati riempiti con acqua *milliO* come controllo negativo. In ogni pozzetto sono stati poi inseriti 4 μL di mix, composta da 2.5 μL di Master Mix SYBR, 0.16 μL di PF(primer forward), 0.15 μL di PR(primer reverse) e 1.2 μL di acqua sterilizzata. Prima di aggiungere nei pozzetti i primers, questi sono stati diluiti con acqua sterilizzata in rapporto 1:10, quindi per ogni 5 μL di primers sono stati aggiunti 45 μL di acqua. Anche i campioni di DNA, prima di essere caricati nei rispettivi pozzetti, sono stati diluiti; questa volta con un rapporto 1:20.

I campioni sono stati quindi caricati nei rispettivi pozzetti attraverso l'uso di una micropipetta dotata di puntali monouso al fine di evitare contaminazioni.

Una volta preparata la piastra per la PCR, questa è stata coperta con un'apposita pellicola per evitare qualsiasi perdita di contenuto per evaporazione e la degradazione del SYBR. Una volta fatto ciò, la piastra ha subito una breve centrifugazione al fine di eliminare eventuali bolle d'aria che avrebbero potuto interferire con la rilevazione delle sonde a fluorescenza, a causa di un diverso indice di rifrazione tra la matrice liquida e quella aeriforme.

Svolti questi passaggi la piastra è stata inserita nello strumento *QuantStudio5Real – TimePCR* (di cui allego qui sotto una fotografia) ed è stata fatta partire la corsa.



Figura 3.3: Fotografia dello strumento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR.

La qPCR (o realtime-PCR) si compone di vari cicli, ognuno dei quali è caratterizzato da tre temperature diverse generate all'azione del termociclatore. La temperatura nella prima fase, chiamata di denaturazione (denaturation), arriva a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, poi scende ad una temperatura compresa tra i $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ e i $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in una fase chiamata di appaiamento (annealing) ed infine si arriva ad un'ultima fase, l'allungamento (elungation), che avviene ad una temperatura di $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In particolare, la fase di denaturazione consiste nell'apertura della struttura a doppia elica del DNA nei due filamenti che lo compongono; poi vi è la fase di appaiamento durante la quale i primers si legano con l'estremità delle sequenze target in posizione $5'$, infine vi è la fase di allungamento nella quale l'enzima DNA polimerasi, partendo dai primers, inizia la sintesi della sequenza complementare del filamento, in direzione $5' \rightarrow 3'$.

L'insieme di queste tre fasi porta pertanto alla formazione di una copia del DNA di partenza, la quale aumenta di numero in funzione esponenziale, in quanto nel ciclo successivo anche il DNA sintetizzato nella PCR funge da stampo.

La tecnica della realtime-PCR, oltre all'amplificazione del DNA, consente anche una quantificazione dei geni target. La quantificazione avviene tramite la rilevazione della fluorescenza, che viene emessa da molecole fluorocrome, che durante la fase di appaiamento si legano ai geni ed emettono fotoni. Grazie all'utilizzo di uno spettrofotometro, al termine di ogni ciclo è pertanto possibile rilevare la quantità di fotoni emessi, che è direttamente proporzionale al numero di ampliconi sintetizzati fino a quel momento (un amplicone è il prodotto della reazione di amplificazione del DNA).

Sfruttando questa relazione è possibile, conoscendo il ciclo al quale si rileva la fluorescenza, risalire alla quantità di DNA iniziale. La rilevazione non è immediata ma sono necessari vari cicli di amplificazione affinché la fluorescenza emessa sia sufficiente a superare il rumore di fondo, quindi sia rilevabile. Il primo ciclo nel quale è rilevabile la fluorescenza è denominato "ciclo soglia"; ciò significa che minore è il valore del ciclo soglia, maggiore sarà la quantità di geni target presente nel campione.

3.4 Analisi statistica

Una volta raccolti i dati dalla qPCR è stato possibile risalire ad una stima di copie geniche a partire dai cicli soglia, a tal fine è stata applicata la seguente equazione da Dong et al. (2020):

$$\text{numero di copie geniche} = 10^{(31-C_t) / (10/3)} \quad (3.1)$$

l'unica differenza apportata all'equazione presente nello studio è stato il limite massimo dei cicli soglia considerati, in questo caso 40:

$$\text{numero di copie geniche} = 10^{(40-C_t) / (10/3)} \quad (3.2)$$

A questo punto le abbondanze delle copie geniche sono state trasformate su scala logaritmica in base 10, utilizzando la seguente conversione:

$$\log(x + 1) \quad (3.3)$$

dove “ $x + 1$ ” serve a mantenere l'informazione di un eventuale campione nullo o 0. Successivamente è stato effettuato il test della normalità di *Shapiro – Wilk*, per verificare se la distribuzione delle stime di copie dei singoli geni fosse normale. Il test ha evidenziato che tutti i geni considerati non presentano distribuzioni normali (p-value < 0.05).

	p-value
16S	< 0.001
<i>nosZ</i>	< 0.001
<i>AOA</i>	< 0.001
<i>AOB</i>	< 0.001

Tabella 3.2: p-value delle variabili considerate nello studio.

Considerati i risultati del test di *Shapiro – Wilk*, la variabilità delle copie geniche è stata analizzata attraverso l'applicazione di un ANOVA a permutazione. Questo test permette di comparare il set di campioni ideali formato attraverso la permutazione stessa con quello effettivamente a disposizione e ricercare pertanto eventuali differenze. Le permutazioni inoltre garantiscono maggior robustezza dei risultati considerando la numerosità dei campioni non elevata. (Kabacoff, R. I. 2015).

L'ANOVA a permutazione ha permesso di valutare la variabilità delle copie geniche rispetto alle medie in funzione al pascolo (Juribello, Venegiotta e Vallazza), alla tipologia (pascolato - non pascolato), all'interazione tra pascolo e tipologia ed infine al periodo da 1 a 4 (“1”: 19/06/2019, “2”: 02/07/2019, “3”: 16/07/2019 e “4”: 23/08/2019).

Il modello applicato nell'ANOVA è il seguente:

$$y = \text{tipologia} * \text{pascolo} + \text{periodo} \quad (3.4)$$

È stata successivamente eseguita un'analisi esplorativa per vedere quali possano essere i fattori che influenzano gli andamenti delle diverse variabili, in questo caso dei geni. A tal fine si è utilizzata la correlazione per ranghi di *Spearman*, considerando la non normalità di alcune variabili prese in esame.

In particolare, l'analisi delle correlazioni prende in considerazione i parametri pedologici e topologici dei pascoli insieme alla copie geniche in base logaritmica. Il grafico riportato nella sezione “risultati e discussione” (fig. 4.1), rappresenta le correlazioni attraverso varie simbologie: nella parte bassa a sinistra del grafico i riquadri presentano i valori numerici delle correlazioni che variano tra -1 e +1. I valori prossimi ad +1 indicano una correlazione positiva, ciò significa che all'aumentare di una

variabile aumenta anche quella ad essa correlata; i valori prossimi a -1 indicano invece una correlazione negativa, quindi all'aumentare di una variabile diminuisce l'altra. Nella parte superiore destra del grafico sono riportate le correlazioni espresse attraverso quadrati di diversa dimensione e colore insieme alla significatività delle relazioni, espresse mediante asterischi. Le dimensioni rappresentano la forza delle correlazioni, mentre i colori la negatività o positività.

Gli asterischi nel grafico indicano invece la significatività, ovvero il valore che esprime in quale percentuale un dato risultato può essere considerato statisticamente significativo: in questo caso perciò indica se una data correlazione sia casuale o sintomo di un'effettiva correlazione.

Più nel dettaglio:

- Un asterisco (*) indica una significatività inferiore a 0.05
- Due asterischi (**) indicano una significatività inferiore a 0.01
- Tre asterischi (***) indicano una significatività inferiore a 0.001

Capitolo 4

Risultati e discussione

Il grafico risultato dell'analisi della correlazione per ranghi di *Spearman* (fig: 4.1) mostra pertanto l'entità delle correlazioni trovate.

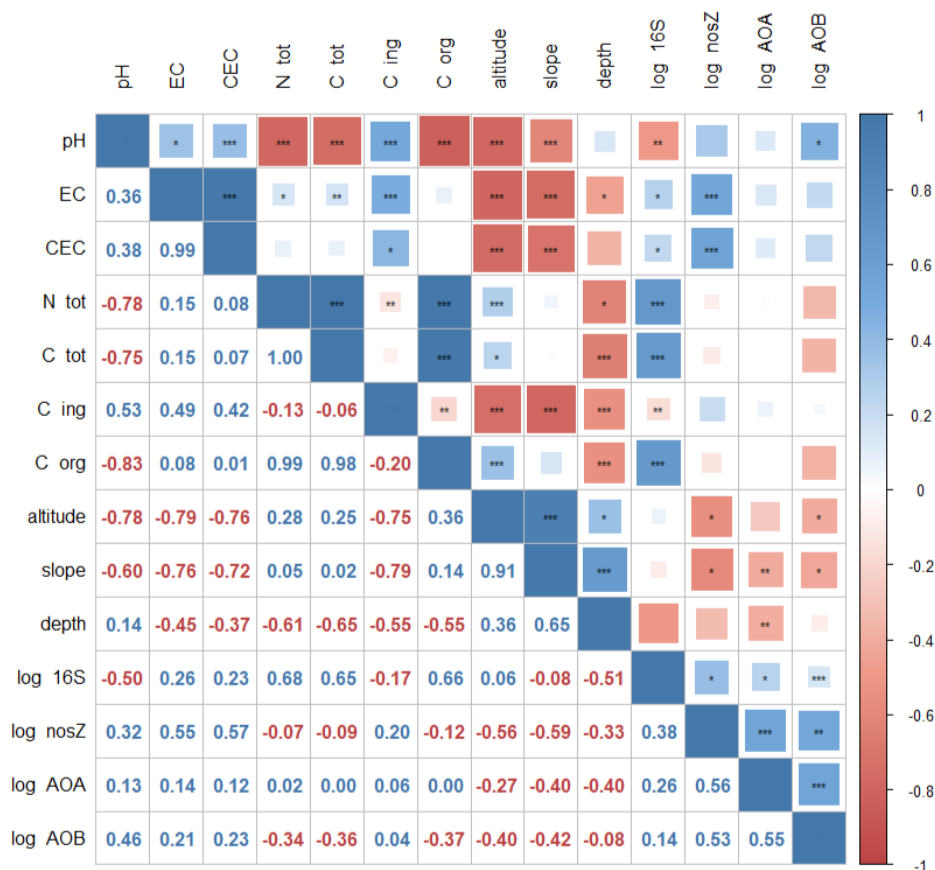


Figura 4.1: Grafico delle correlazioni.

Le correlazioni più interessanti per quanto riguarda i geni coinvolti nel ciclo dell'azoto sono quelle che coinvolgono l'altitudine, la pendenza e la profondità; per quanto concerne invece l'abbondanza delle comunità di Archaea e Bacteria, espressa tramite il 16S, sono il C_{organico}, il C_{tot} e l'N_{tot}.

Da queste correlazioni si evince che all'aumentare della pendenza del suolo diminuiscono in modo rilevante i microrganismi, soprattutto i denitrificanti; lo stesso risulta all'aumentare dell'altitudine. Per quanto riguarda la profondità, invece, vi è sempre una correlazione negativa con l'abbondanza microbica ma questa volta di un valore minore e gli *Ammonia Oxidizing Bacteria* non ne sembrano coinvolti.

Per quanto riguarda invece l'abbondanza delle comunità di Archaea e Bacteria, riassunta nel valore del 16S, questa è correlata positivamente, con un'elevata significatività ($p\text{-value} < 0.001$), con il C_{organico} , il C_{tot} e l' N_{tot} . Da questa correlazione è possibile affermare che un suolo ricco di nutrienti e composti organici possa essere ottimo per la crescita del microbiota, garantendo così un buon funzionamento dell'ecosistema.

Per ogni gene si sono utilizzati dei *boxplot*, ovvero delle rappresentazioni statistiche che permettono di descrivere una variabile quantitativa anche se questa non segue un andamento normale ma si è in presenza di outliers o di asimmetrie pronunciate.

I *boxplot* permettono una buona rappresentazione del campione nonostante un'asimmetria molto pronunciata, come appunto una distribuzione dell'abbondanza dei geni nel suolo. In particolare, il *boxplot* è composto da una "scatola" e due "baffi".

La scatola comprende tutti i valori compresi tra il 25° percentile e il 75° percentile, mentre i baffi raffigurano la variazione dei dati attesa e si estendono per 1,5 volte l'IQR (InterQuantil Range, ovvero l'estensione della scatola). I punti che si trovano distanti dai baffi rappresentano outliers (o errori nelle misure), ovvero valori che non sono compresi nella variazione attesa.

Il 25°, anche detto "primo quartile", è quel valore che è maggiore del 25% dei dati e minore del rimanente 75%, definizione analoga vale per il 75° percentile, ovvero il terzo quartile. All'interno della scatola è presente una linea che sta ad indicare la mediana: essa indica il numero che occupa la posizione centrale in un insieme di valori, tra i quali metà risultano maggiori della mediana e metà minori.

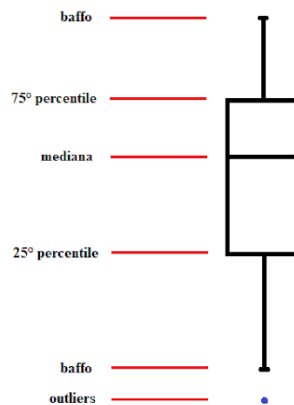


Figura 4.2: *Figura esplicativa boxplot.*

Più grande è il box, più la dispersione delle misure è grande e ciò implica un'alta variabilità. Questa variabilità è sintomo di un'eterogeneità nelle misure che implica una dipendenza da più fattori; come si vedrà nei grafici successivi, le varie misure sono spesso affette da un'elevata dispersione e di conseguenza sono influenzate da molteplici fattori e solo in alcuni casi è pertanto carpibile un'evidente dipendenza diretta.

I valori riportati in ogni grafico rappresentano l'abbondanza del gene nel campione, espressa come logaritmo in base 10. Ricorrere al logaritmo è necessario in quanto i dati non sono distribuiti come

una gaussiana in maniera continua ma sono affetti da forte asimmetria: il logaritmo permette quindi una rappresentazione più chiara di questo tipo di dati, riducendone le differenze grafiche.

La sigla 16S indica un gene presente nell'rna ribosomiale, usualmente utilizzato per i sequenziamenti. In questo caso esprime un valore che indica l'abbondanza generale nel suolo di Bacteria e Archaea; si sfrutta questo particolare gene in quanto è dotato di caratteristiche peculiari: è specie specifico, essendo all'interno dei ribosomi è presente in grande quantità ed è di facile lettura (ha una sequenza non eccessivamente lunga da rendere difficile la lettura ma sufficientemente estesa da contenere differenze tra una specie e l'altra).

Nel grafico qui riportato (fig: 4.3) è stato utilizzato un modello che mette in relazione i dati ricavati sul 16S con i diversi siti campionati.

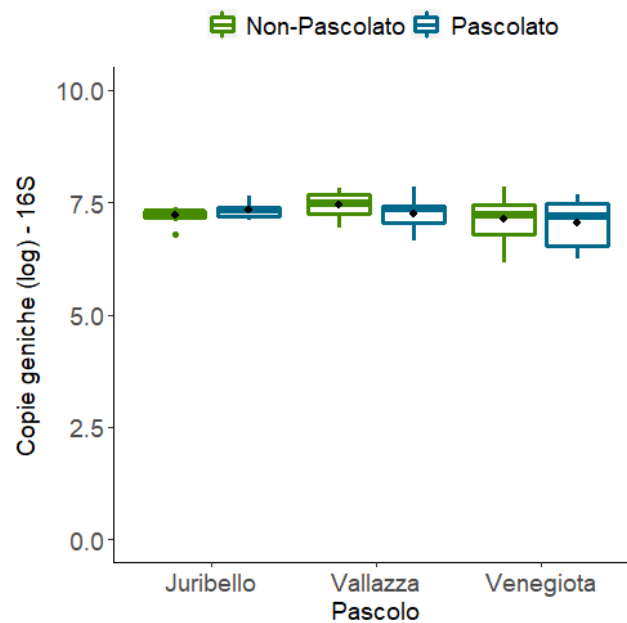


Figura 4.3: Grafico sul 16S in relazione al pascolamento.

In questo caso i dati non evidenziano differenze sui campioni di suolo che hanno subito pascolamento rispetto a quelli contenuti nelle gabbie di esclusione. Di conseguenza, è possibile affermare che sulla base dei dati raccolti la variabilità genetica generale degli Archaea e dei Bacteria non è influenzata in modo rilevabile dal pascolamento, almeno nel breve termine.

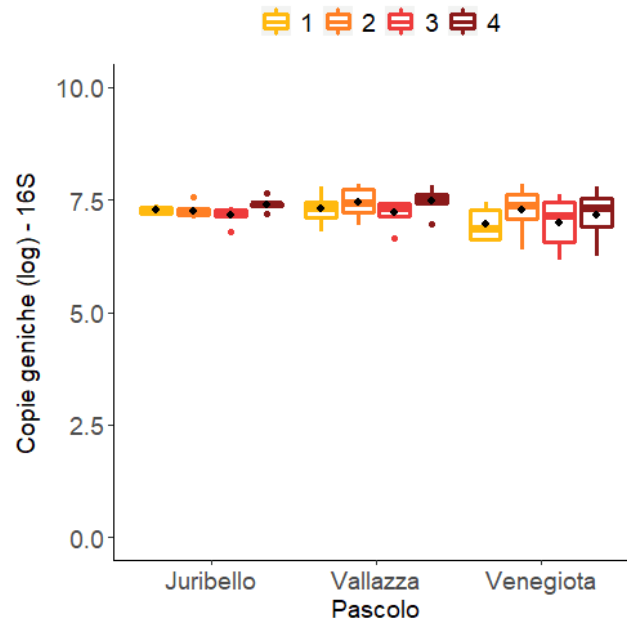


Figura 4.4: Grafico sul 16S in relazione al periodo di campionamento.

Per quanto riguarda il grafico relazionato al periodo di campionamento (fig: 4.4), questo mostra come, anche in questo caso, la variabilità genetica si mantiene costante nonostante le diverse tempistiche considerate. Ciò può implicare una notevole resistenza della componente microbica alle variazioni di temperatura e umidità a cui è soggetto il suolo durante le date dei campionamenti. I periodi considerati si estendono dal mese di giugno (periodo 1) a quello di agosto (periodo 4), quindi è possibile affermare che la comunità microbica dei vari pascoli è in grado di avere una densità piuttosto costante all'interno di questo lasso di tempo. Questo dato è avvalorato dal fatto che le aree di pascolo analizzate sono gestite come tali da diverso tempo; è ragionevole ritenere per cui che le varie popolazioni microbiche si siano adattate alle condizioni locali.

Nel seguente grafico (fig: 4.5) è rappresentata la presenza di Archaea (AOA) in funzione del sito tenendo conto del fattore pascolamento.

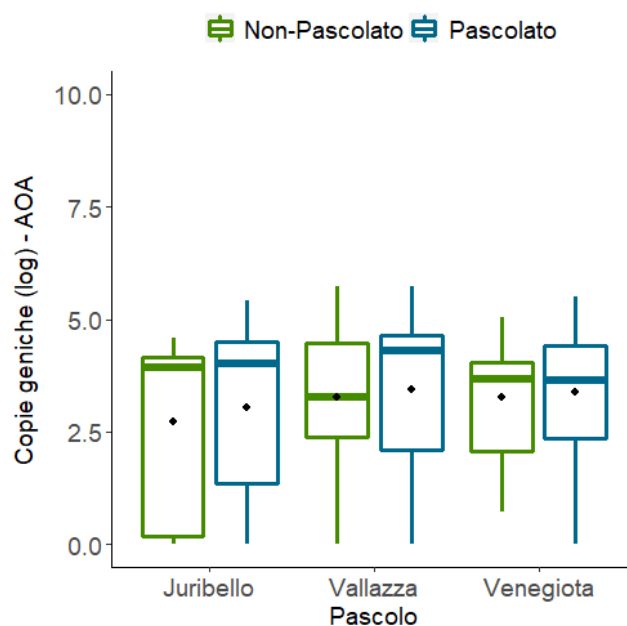


Figura 4.5: Grafico sull'AOA in relazione al pascolamento.

In questo caso si può osservare una leggera tendenza, per ogni pascolo, ad avere un'abbondanza di Archaea maggiore nelle aree pascolate, rispetto a quelle non pascolate. Questa però è una tendenza minima che può essere considerata trascurabile data l'entità dell'errore di cui sono affette le misure. In questo caso i risultati si discostano dagli studi precedenti che invece evidenziano come l'abbondanza di AOA sia più elevata nel caso di prati non pascolati rispetto a quelli pascolati. (Lu Zhang et al. 2021)

Risultato analogo si può riscontrare nell'analisi dell'abbondanza degli Archaea, questa volta in relazione al periodo di campionamento. (fig: 7.4)

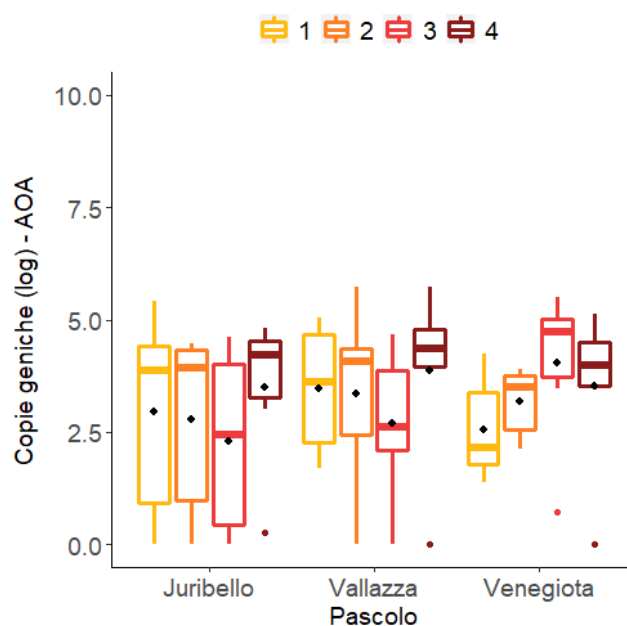


Figura 4.6: Grafico sull'AOA in relazione al periodo di campionamento.

Anche in questo caso infatti sembrano esserci delle tendenze, anche se non uguali nei tre siti: per

quanto concerne le malghe Juribello e Vellazza, l'abbondanza degli Archaea sembra diminuire dal periodo 1 fino al periodo 3, per poi risalire in corrispondenza del periodo 4. Nella malga Venegiota invece si osserva un trend diverso: l'abbondanza cresce dal periodo 1 fino al periodo 3, per poi avere un crollo in corrispondenza del periodo 4 rispetto al precedente.

Da questo grafico perciò si evince che esiste una variabilità temporale. Questa però è difficilmente interpretabile considerando solamente i parametri dello studio, piuttosto è ragionevole ritenere che le differenze nell'abbondanza di *AOA* nel tempo siano legate a diversi fattori tempo-dipendenti, non considerati nello studio, e che questi siano diversi nelle aree campionate.

Queste stesse analisi sono state effettuate anche per gli *ammonia oxidizing* nella variante dei Bacteria, denominata *AOB*. Anche in questo caso i dati sono stati utilizzati per la realizzazione di due grafici. Il primo grafico mette in relazione l'abbondanza dei Bacteria in relazione al pascolamento (fig: 4.7), il secondo invece è in relazione al periodo di campionamento (fig: 4.8).

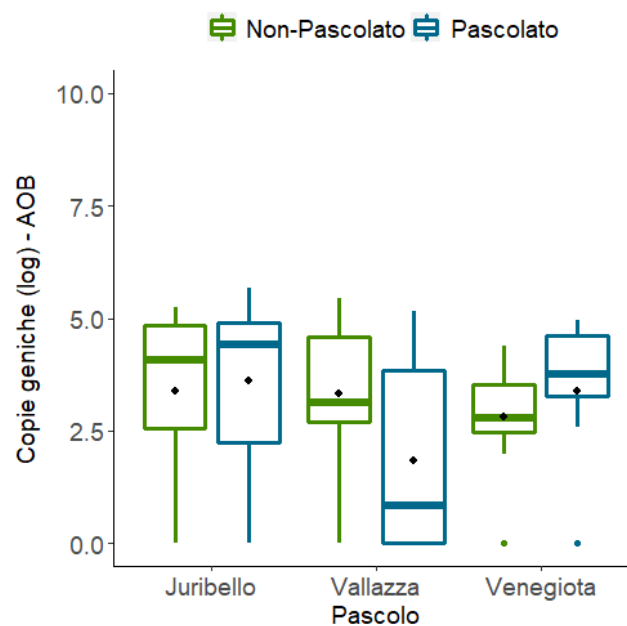


Figura 4.7: Grafico sull'*AOB* in relazione al pascolamento.

In questo grafico ogni pascolo ha un trend diverso per ogni sito: su due malghe (Juribello e Venegiota) sembra aumentare, mentre su una (malga Vallazza) diminuisce. Queste in ogni caso sono tendenze molto labili che non possono essere considerate tali data l'entità dell'errore di cui le misure sono affette; per questo motivo non è possibile affermare che il pascolamento influenzi in modo rilevabile l'abbondanza dei Bacteria. Da studi precedenti invece sembra evidente come l'*AOB* sia più abbondante nel caso di prati pascolati. (Lu Zhang et al. 2021)

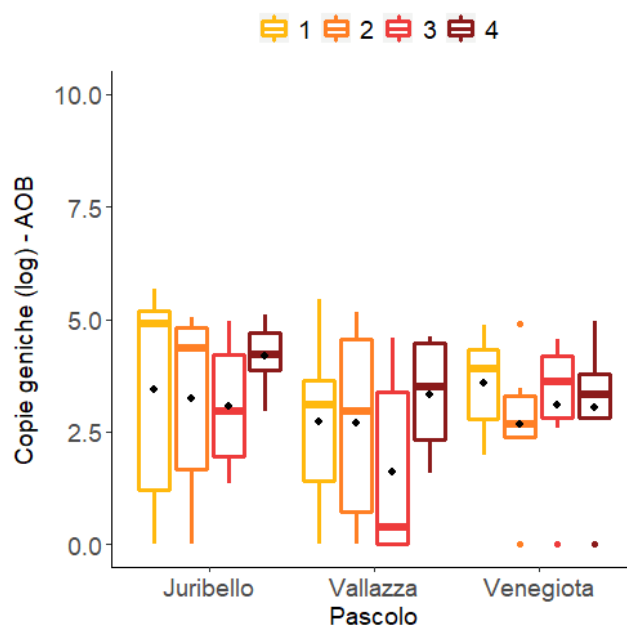


Figura 4.8: Grafico sull'AOB in relazione al periodo di campionamento.

Questo grafico è molto interessante in quanto evidenzia un andamento molto simile a quello riscontrato nel grafico sugli Archaea in relazione con il periodo di campionamento (fig: 4.7). Anche in questo caso i trend non sono statisticamente validi in quanto l'errore sulle misure è troppo grande; nonostante questo, resta possibile il fatto che vi siano fattori tempo-dipendenti che vadano a modificare le popolazioni di Archaea e Bacteria in modo simile. Questa ipotesi, per poter essere considerata valida, deve essere sicuramente avvalorata da ulteriori studi che mirino ad analizzare fattori che in questo studio non sono stati presi in considerazione.

L'ultimo gene considerato è quello che ha mostrato una maggior dipendenza dalle variabili prese in esame, il gene responsabile della denitrificazione: il *nosZ*.

Come negli altri casi si sono realizzati due grafici.

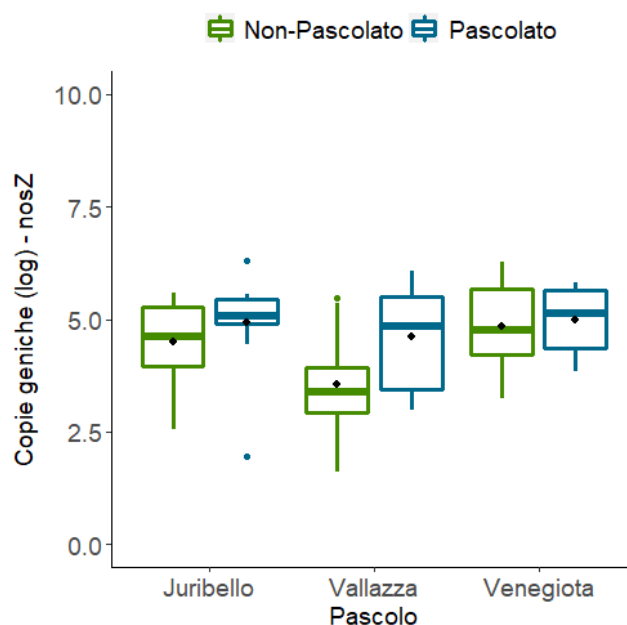


Figura 4.9: Grafico sul *nosZ* in relazione al pascolamento.

Questo grafico è di grande interesse per questo studio in quanto evidenzia una relazione tra l'abbondanza del gene *nosZ* ed il pascolamento. In particolar modo, il pascolamento si dimostra un fattore in grado di aumentare significativamente l'abbondanza del gene responsabile della denitrificazione nel suolo. Questo risultato è più evidente nelle malghe Juribello e Vallazza mentre è molto meno marcato, se non inesistente, nella malga Venegiota. In questo caso studi precedenti mostrano risultati diversi, ovvero un'abbondanza di *nosZ* maggiore in prati non pascolati. (Lu Zhang et al. 2021)

Per quanto riguarda la relazione che vi è tra il gene *nosZ* e il periodo di pascolamento (fig: 4.10) i risultati sono meno chiari.

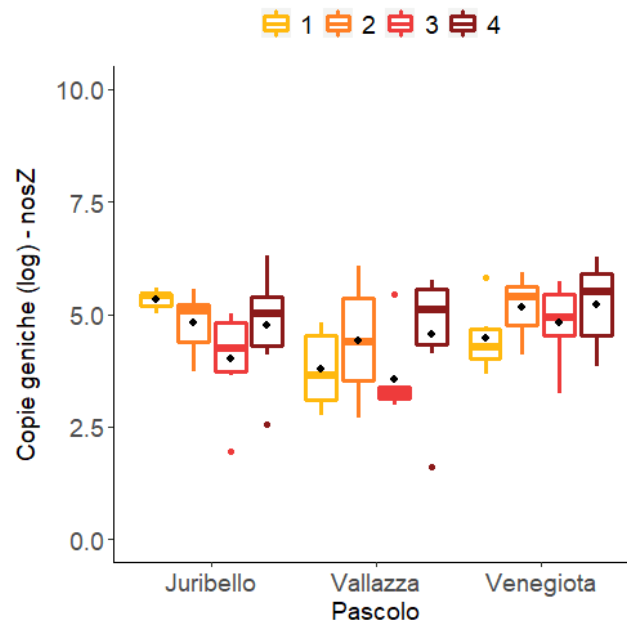


Figura 4.10: Grafico sul *nosZ* in relazione al periodo di campionamento.

In questo caso infatti sembra che il fattore tempo giochi un ruolo importante nell'abbondanza del gene ma non in modo chiaro e descrivibile tramite questo grafico. Per esporre in modo valido questa dipendenza è necessario pertanto eseguire altri studi mirati ad approfondire questo tema.

Capitolo 5

Conclusioni

Dai dati dello studio si evince che il pascolo influenza la composizione e l'abbondanza della comunità microbica nel suolo, andando potenzialmente a modificare l'efficienza del ciclo dell'azoto in esso.

Questo si può affermare soprattutto sulla base dei risultati emersi dalle analisi del *nosZ*; questo gene infatti è quello che si è rivelato più sensibile al pascolamento. Dai grafici si evidenzia infatti come, nei campioni pascolati, il gene sia più abbondante. Questo è un dato molto importante dal quale si può dedurre che il pascolamento ha un ruolo positivo per il buon funzionamento dell'ecosistema, in quanto incrementa il potenziale di denitrificazione limitando l'emissione del protossido di azoto (N_2O), gas clima-alterante, e garantisce la chiusura del ciclo dell'azoto.

Tale affermazione però, per essere messa in pratica in un'ottica di buona gestione del territorio, dev'essere accompagnata da ulteriori studi che mirino ad approfondire altri aspetti legati al pascolo e le sue conseguenze. Al fine di salvaguardare habitat ecologicamente fondamentali ed economicamente importanti, quali le praterie ad alta quota, è necessario definire pertanto il carico ottimale degli animali al pascolo, l'eventuale necessità di un'integrazione di nutrienti, il periodo di pascolamento e come tutti questi aspetti impattino l'ecosistema.

È interessante inoltre sottolineare come nei vari trend analizzati nella sezione “Risultati e discussione” spesso la malga Vallazza si discosti dalle altre due. Questo comportamento può essere ragionevolmente attribuito alla diversa pratica di gestione dell'attività: la malga Vallazza infatti viene considerata più “estensiva” rispetto alle altre due e ciò significa che viene data più importanza all'allevamento di vacche di razza locale rispetto a razze normalmente allevate nei sistemi intensivi; esse inoltre hanno un'estensione su cui pascolare più ampia e nella quale vengono distribuiti meno concentrati. Questa differenza molto probabilmente è responsabile dei valori leggermente più bassi che si sono trovati nei campioni delle aree pascolate.

In conclusione, è possibile affermare che esistono ecosistemi molto importanti nei quali è fondamentale garantire una buona biodiversità microbica al fine di assicurare le funzioni ecosistemiche. Questo studio ha avuto come obiettivo dimostrare che essa dipende non solo da aspetti morfologici come altitudine, pendenza e profondità, sulle quali l'azione antropica non influisce, ma anche da pratiche di gestione delle attività locali. Il pascolamento in primis è quindi in grado di influenzare il ciclo dell'azoto ma per capire esattamente come e quanto ciò avvenga sono necessari ulteriori studi che ne approfondiscano gli aspetti.

Capitolo 6

Bibliografia

Raniolo, S., Squartini, A., Ramanzin, M., Sturaro, E. (2019). RELAZIONE TRA IL PASCOLAMENTO BOVINO, MICROBIOLOGIA DEL SUOLO E CICLI DEI NUTRIENTI NEI PASCOLI DI ALTA QUOTA. I SERVIZI ECOSISTEMICI opportunità di crescita per l'allevamento in montagna?, 163.

Pennesi, R., Catorci, A., Tardella, D. F. M. & Ducoli, D.V. Biodiversità e gestione dei pascoli di malga nel Parco Naturale di Paneveggio -/ Pale di San Martino

Costanza, R., D'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. v., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P., van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 1997 387:6630, 387(6630), 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>

ANMS, 2011. Dossier WWF:BIODIVERSITÀ: UNA RICCHEZZA INSOSTITUIBILE. Retrieved September 12, 2022, from http://d24qi7hsckwe9l.cloudfront.net/downloads/dossier_wwf_biodiversita_ricchezza_insos

Giuseppe Maria, Carpaneto - “Ecosistema”. *Enciclopedia della scienza e della tecnica*, 2008. https://www.treccani.it/enciclopedia/ecosistema_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/. Consultato in data 10/09/2022

Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2018.9>

La Foresta di Paneveggio - Parco Naturale Paneveggio Pale di San Martino. (n.d.). Retrieved September 16, 2022, from <https://www.parcopan.org/poi/la-foresta-di-paneveggio/>

Il Piano del Parco Parco Naturale paneveggio Pale di San Martino. (2016). Retrieved September 17, 2022, from <https://www.parcopan.org/ente-parco/il-piano-del-parco/>

Lindsay, E. A., Colloff, M. J., Gibb, N. L., Wakelin, S. A. (2010). The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5547–5555. <https://doi.org/10.1128/AEM.03054-09>

Reid, W.V.; Mooney, H.A.; Cropper, A.; Capistrano, D.; Carpenter, S.R.; Chopra, K.; Dasgupta, P.; Dietz, T.; Duraiappah, A.K.; Hassan, R.; Kasperson, R.; Leemans, R.; May, R.M.; McMichael, A.J.; Pingali, P.; Samper, C.; Scholes, R.; Watson, R.T.; Zakri, A.H.; Shidong, Z.; Ash, N.J.; Bennett, E.; Kumar, P.; Lee, M.J.; Raudsepp-Hearne, C.; Simons, H.; Thonell, J.; Zurek, M.B. (2005). *Ecosystems and human well-being - Synthesis: A Report of the Millennium Ecosystem Assessment*

Mencel, J., Mocek-Płóćiniak, A., Kryszak, A. (2022). Soil Microbial Community and Enzymatic Activity of Grasslands under Different Use Practices: A Review. *Agronomy*, 12(5), 1136. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051136>

Mocali, S. (n.d.). Indicatori di biodiversità per la sostenibilità in agricoltura CRA-Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo Analisi della biodiversità del suolo.

Pearce, B. K. D., Tupper, A. S., Pudritz, R. E., Higgs, P. G. (2018). Constraining the Time Interval for the Origin of Life on Earth. *Astrobiology*, 18(3), 343–364. <https://doi.org/10.1089/AST.2017.1674>

Rete Natura 2000 — Ministero della Transizione Ecologica. (n.d.). Retrieved September 16, 2022, from <https://www.mite.gov.it/pagina/rete-natura-2000>

Ribeiro, D. (2013). Processo de Haber-Bosch. *Revista de Ciência Elementar*, 1(1). <https://doi.org/10.24927/RCE20130101>

C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4576>

Capitolo 7

Allegati

7.1 Allegato 1

Quick-Start Protocol

May 2019

DNeasy® PowerSoil® Pro Kit

Solution CD2 should be stored at 2–8 °C upon arrival. All other reagents and kit components should be stored at room temperature (15–25 °C).

Further information

- *DNeasyPowerSoilProKitHandbook*: www.qiagen.com/HB-2495
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
 - If Solution CD3 has precipitated, heat at 60 °C until precipitate dissolves.
 - Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25 °C).
1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of soil and 800 µl of Solution CD1. Vortex briefly to mix.
 2. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.
note: If using the Vortex Adapter for more than 12 preps simultaneously, increase the vortexing time by 5–10 min.
note: For more information about other bead beating methods, see the “Protocol: Detailed” section of *DNeasyPowerSoilProKitHandbook*.
 3. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 1 min.
 4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some soil particles.
 5. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.

6. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min at room temperature. Avoiding the pellet, transfer up to 700 μ l of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
note: Expect 500–600 μ l.
7. Add 600 μ l of Solution CD3 and vortex for 5 s.
8. Load 650 μ l of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
9. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
10. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
11. Add 500 μ l of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
12. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
13. Add 500 μ l of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
14. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).
15. Centrifuge at up to 16,000 x g for 2 min. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube (provided).
16. Add 50–100 μ l of Solution C6 to the center of the white filter membrane.
17. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.
note: We recommend storing the DNA frozen (–30 to –15 °C or –90 to –65 °C) as Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA, please refer to the Troubleshooting Guide.

7.2 Allegato 2

	stima	Probabilità
Tipologia pascolato	-0,10445	0,863
Pascolo Juribello	-0,29853	0,686
Pascolo Vallazza	0,15876	0,655
Pascolato - pascolo Vallazza	-0,05638	0,902
Pascolato - pascolo Juribello	0,01772	1
Periodo 1	-0,19252	0,292
Periodo 2	-0,07274	0,882
Periodo 3	-0,181	0,571
Residuo	1,8	
R2	0,04	

Tabella 7.1: Risultati della permutazione ANOVA sull'abbondanza di AOA in funzione del pascolamento e del sito campionato

	stima	Probabilità
Tipologia pascolato	0,1137	0,486
Pascolo Juribello	0,4318	0,1417
Pascolo Vallazza	-0,4747	0,2094
Pascolato - pascolo Vallazza	-0,2237	0,8431
Pascolato - pascolo Juribello	0,6192	0,0171
Periodo 1	0,1956	0,3961
Periodo 2	-0,1881	0,5962
Periodo 3	0,4607	0,148
Residuo	1,75	
R2	0,15	

Tabella 7.2: Risultati della permutazione ANOVA sull'abbondanza di AOB in funzione del pascolamento e del sito campionato

	stima	Probabilità
Tipologia pascolato	-0,27041	0,0258
Pascolo Juribello	0,14971	1
Pascolo Vallazza	-0,49252	0,0006
Pascolato - pascolo Vallazza	0,05461	1
Pascolato - pascolo Juribello	-0,25941	0,0856
Periodo 1	-0,05036	0,2711
Periodo 2	0,22558	0,7255
Periodo 3	-0,44479	0,0898
Residuo	0,96	
R2	0,28	

Tabella 7.3: Risultati della permutazione ANOVA sull'abbondanza di *nosZ* in funzione del pascolamento e del sito campionato

7.3 Allegato 3

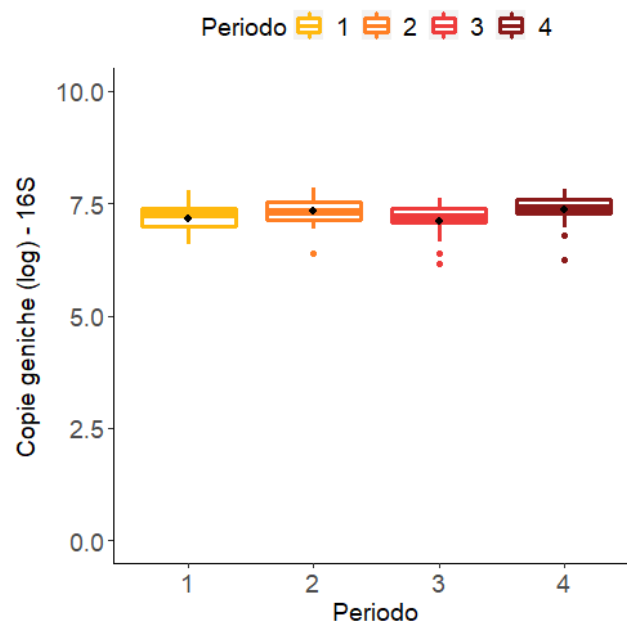


Figura 7.1: Grafico sul 16S in relazione al periodo di campionamento senza considerare l'interazione con il pascolo.

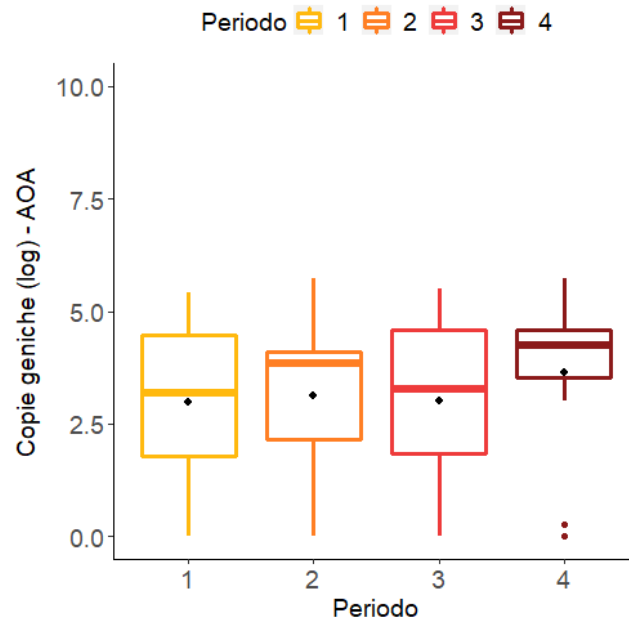


Figura 7.2: Grafico sull'AOA in relazione al periodo di campionamento senza considerare l'interazione con il pascolo.

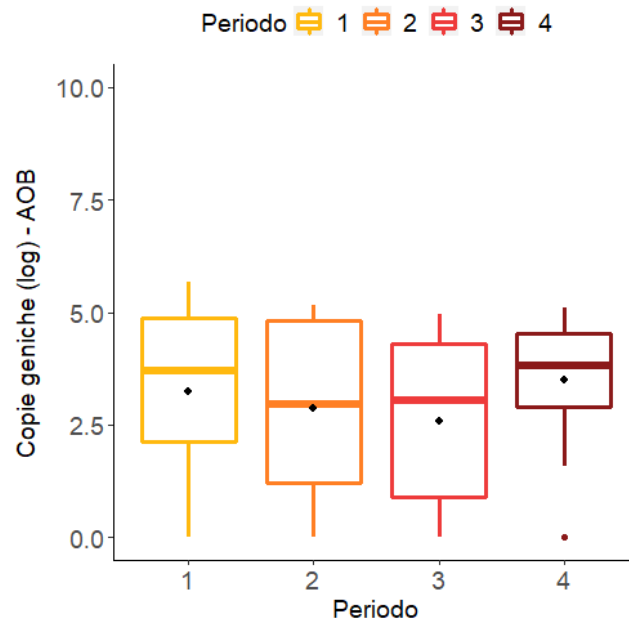


Figura 7.3: Grafico sull'AOB in relazione al periodo di campionamento senza considerare l'interazione con il pascolo.

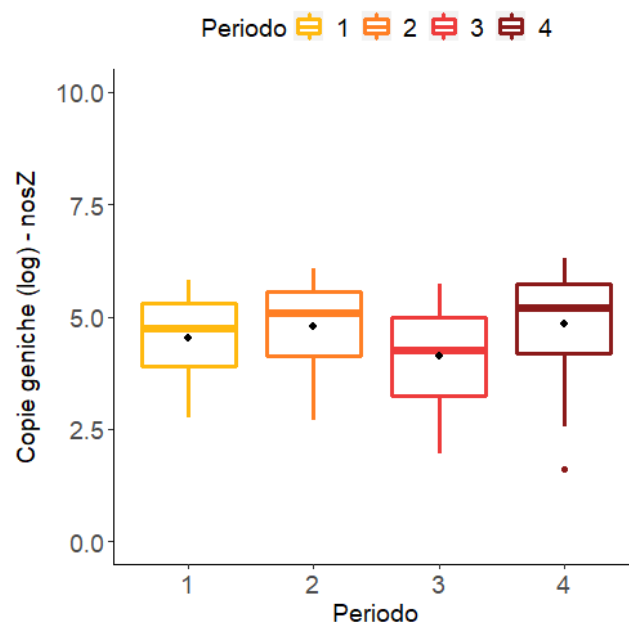


Figura 7.4: Grafico sul *nosZ* in relazione al periodo di campionamento senza considerare l'interazione con il pascolo.