

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. TERRITORIO E SISTEMI AGROFORESTALI

Dip. AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Tecnologie Forestali e Ambientali

Quantificazione mediante Real Time PCR di geni fungini e batterici  
in suoli a faggeta e pecceta del Parco delle Dolomiti Bellunesi

Relatore:  
Prof. Serenella Nardi

Laureando:  
Francesco Zinato

Matricola n.  
2007535

ANNO ACCADEMICO: 2022-2023

## Sommario

<b>2. Premesse .....</b>	<b>3</b>
2.1 Vegetazione e Suolo.....	3
2.2 Ruolo dei microrganismi nel suolo .....	4
2.3 Studio del suolo da un punto di vista microbiologico tramite le analisi molecolari: Real time qPCR .....	6
2.4 Funghi .....	7
2.5 Batteri .....	8
2.6 Ciclo dell'azoto.....	9
2.7 Il ciclo fase dopo fase: l'influenza delle comunità microbiche .....	12
2.7.1 Fissazione dell'azoto .....	12
2.7.2 Assimilazione dell'azoto .....	13
2.7.3 Mineralizzazione .....	13
2.7.4 Nitrificazione .....	13
2.7.5 Denitrificazione .....	14
<b>3. Obiettivi.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Materiali E Metodi .....</b>	<b>16</b>
4.1 Inquadramento stazionale.....	16
4.1.1 Inquadramento morfologico-topografico.....	16
4.1.2 Inquadramento climatico .....	16
4.1.3 Inquadramento pedologico.....	18
4.1.4 Inquadramento vegetazionale.....	18
4.1.5 Inquadramento dendrometrico-forestale.....	19
4.2 Campionamento .....	24
4.2.1 Distinzione degli orizzonti .....	24
4.3 Analisi DNA .....	27
4.3.1 Pesa.....	27
4.3.2 Estrazione .....	27
4.3.3 Quantificazione Qubit .....	27
4.3.4 Real time qPCR.....	27
4.4 Analisi chimiche .....	28
4.4.1 Principio.....	28
4.4.2 Procedimento.....	29
4.5 Analisi del pH.....	29
4.5.1 Principio.....	30
4.5.2 Procedimento.....	30
<b>5. Elaborazione dei dati e risultati.....</b>	<b>31</b>
5.1 Conversione da Ct a copie geniche.....	31
5.2 Confronto delle medie tramite test post-hoc .....	31
5.3 Studio delle correlazioni tra i vari parametri .....	33
5.4 Analisi delle Componenti Principali (PCA) .....	33
<b>6. Discussione.....</b>	<b>36</b>
<b>7. Conclusioni .....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>43</b>
<b>Appendice.....</b>	<b>46</b>

## 1. Introduzione

Secondo gli studi di Richardson (2013), l'interazione tra la componente del suolo e quella vegetale ha un ruolo fondamentale nello sviluppo a lungo termine dei popolamenti forestali. I boschi italiani dell'arco alpino sono caratterizzati in larga parte da una copertura forestale costituita da faggeta e pecceta. Può essere interessante confrontare questi due sistemi forestali tipici del territorio montano italiano, nell'ottica di comprenderne le differenze microbiologiche, con l'obiettivo di evidenziare nei due sistemi vegetali, la diversa relazione tra attività microbica e gli altri fattori, anche chimici, che caratterizzano i due distinti substrati.

Nelle premesse si sono effettuati i passaggi logici, riassunti brevemente di seguito, necessari a collegare la vegetazione, il suolo e i microrganismi in quanto attori dei principali processi biogeochimici che coinvolgono la pedosfera.

Avendo organismi, come funghi e batteri, un ruolo centrale nei cicli dei nutrienti e nella degradazione della materia organica, determinarne l'abbondanza significa capire l'andamento di questi processi nei due diversi ambienti. La comprensione della ricchezza di suoli forestali a livello biologico ricopre anche un'importanza considerevole intendendola come strumento di comparazione a situazioni prettamente agrarie. Infatti, mentre i terreni coltivati sono controllati da lavorazioni, distribuzione di fertilizzanti e altre tecniche colturali, la fertilità dei terreni naturali, in particolare forestali, è controllata dalla velocità e dall'entità dei processi che regolano la decomposizione della Sostanza Organica (S.O.) nel substrato (Dibona, 1984).

A questo proposito nelle premesse viene analizzata con particolare attenzione l'attività dei microrganismi coinvolti nel ciclo dell'azoto.

I campionamenti, effettuati presso la località di passo Croce d'Aune nel parco delle Dolomiti Bellunesi, sono stati esaminati sia da un punto di vista chimico, sia grazie all'analisi del DNA tramite la *Real Time qPCR* e l'utilizzo di alcuni geni funzionali.

Studiare i risultati ottenuti dalle suddette analisi ha permesso di evidenziare differenze ma anche relazioni, dirette e indirette, tra l'attività di questi organismi e le caratteristiche chimiche nei due distinti contesti. Questi esiti hanno anche evidenziato però come sia più significativa e riscontrabile una eterogeneità tra i vari orizzonti del suolo piuttosto che tra substrati caratterizzati da diversa vegetazione.

## 2. Premesse

### 2.1 Vegetazione e Suolo

Come primo passaggio del nostro ragionamento è opportuno sottolineare che il lavoro confronta siti nella stessa area geografica che differiscono soprattutto per la loro superficie forestale. Uno di essi, infatti, è un popolamento di faggio, l'altro di abete rosso.

Questa grande differenza su cui si baseranno la maggior parte delle nostre riflessioni, ci permette di ragionare su quanto la copertura forestale sia determinante quando si parla di suolo e di processi pedogenetici.

Per primo Jenny nel 1958 afferma che la vegetazione sia in stretta relazione con il clima e il suolo. Queste interazioni vengono descritte da un triangolo (Fig. 2.1): in cui il clima influenza sia i processi del suolo sia quelli della copertura vegetale e in cui questi ultimi sono in grado di condizionarsi vicendevolmente.

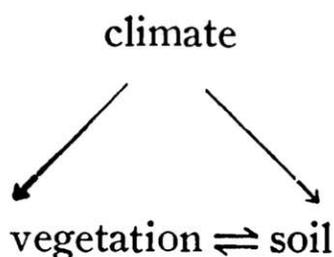


Figura 2.1 Rappresentazione grafica dell'interazione tra clima suolo e vegetazione (Jenny 1958).

La visione di Jenny nel considerare suolo e vegetazione prevede l'utilizzo del concetto di "tessera", ipotizzando la possibilità di valutare individualmente questa unità fondamentale costituita sia da suolo che da vegetazione che da tutti gli altri aspetti dell'equazione di stato. Applicando l'equazione al concetto di tessera, il cui mosaico dovrebbe essere nel suo insieme il paesaggio, si ottengono cinque diverse tipologie di tessere divise per funzioni. Tra queste troviamo quella "biofunzionale" alla quale possiamo ricondurre il ruolo centrale della vegetazione.

Nonostante lo studio in questione sia datato, al suo interno venivano proposte modalità di esperimenti con finalità simili a quella di questo lavoro, nell'ottica di dimostrare l'influenza di un tipo vegetazionale e del cosiddetto *plant-factor* sul suolo e sui processi pedogenetici (Jenny, 1958).

Molteplici pubblicazioni ed esperimenti cronologicamente successivi alle considerazioni di Jenny confermano questa connessione.

Negli ecosistemi forestali in particolare, a differenza di quelli agrari, la componente arborea costituisce anche la fonte principale di materia organica che arriva al terreno (Paterson, 2008). Questa, che comprende foglie, frutti, rami ma in alcuni casi anche fusti e radici, costituirà la lettiera. Il processo di degradazione della lettiera, a seconda della specie arborea che forma il popolamento, avverrà con maggiore o minore velocità, influenzando in questo modo anche la quantità di acidi organici prodotti dai microrganismi nel suolo. È la rapidità con cui avviene il processo di mineralizzazione, ad esempio, che condiziona il livello e la disponibilità di nutrienti che, insieme all'entità di svolgimento delle dinamiche di umificazione e produzione di sostanze umiche, influenzano la struttura e la fertilità del substrato. (Dibona, 1984).

La rapidità e il tasso di degradazione sono collegati alla presenza di sostanze recalcitranti come lignina e fenoli che aumentano di molto i tempi di questo processo. Questa lentezza ha tra le conseguenze una acidificazione del suolo e una influenza negativa su tutti i processi legati al ciclo dell'azoto (Staňková et al., 2015).

Un'altra conseguenza fondamentale è il diverso rapporto C/N che si ottiene in popolamenti di latifoglie caduche e di conifere sempreverdi. In un ambiente come la faggeta, infatti, il *turnover* avviene con maggiore rapidità e il carbonio, presente in composti più facilmente decomponibili, viene assimilato e reso disponibile ai microrganismi, che lo consumano. Questo processo causa una forte diminuzione del C/N in faggeta rispetto alla pecceta (Wang e Fernandez, 1999).

Le lettiere di faggio e di abete rosso sono estremamente differenti: le prime sono riconosciute anche in letteratura per essere recalcitranti (Šantrůčková et al., 2006), le seconde invece per possedere un turnover della *Soil Organic Matter* (SOM) estremamente rapido.

Confrontare quindi sistemi con un soprassuolo così marcatamente distinto nelle sue caratteristiche, può essere particolarmente efficace e può portare a evidenziare differenze significative.

## 2.2 Ruolo dei microrganismi nel suolo

Come anticipato, il lavoro andrà ad analizzare il suolo sia da un punto di vista chimico, ma anche e soprattutto nel suo aspetto microbiologico.

Il terreno è un ambiente estremamente ricco di vita (Fig. 2.2): tra i microrganismi troviamo eubatteri, archeobatteri, funghi e alghe; ad esempio, si stima che in un grammo di suolo siano presenti circa 4000 diverse unità geniche di batteri (Torsvik et al., 1990).

La maggior parte dei processi fisici e chimici legati alla pedogenesi è guidata da microrganismi: i cicli dei nutrienti, la decomposizione della materia organica e persino la degradazione del substrato roccioso (Fig. 2.4). Riassumendo e definendo meglio questi processi citiamo mineralizzazione, strettamente connessa al ciclo dell'azoto, aggregazione (Fig. 2.3), ovvero la formazione della struttura, e umificazione (Varma e Choudhary, 2019). L'enorme abbondanza e ricchezza specifica di microrganismi fungini e batterici ci permette di studiare le loro fondamentali funzioni all'interno delle dinamiche sopra citate.

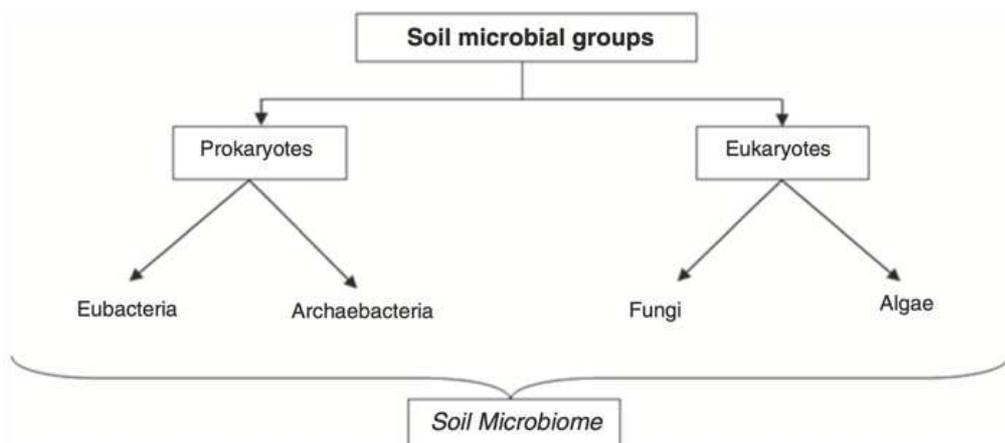


Figura 2.2 Diversità dei microrganismi presenti nel suolo: divisione nei principali Regni e Phyla (Varma e Choudhary, 2019).

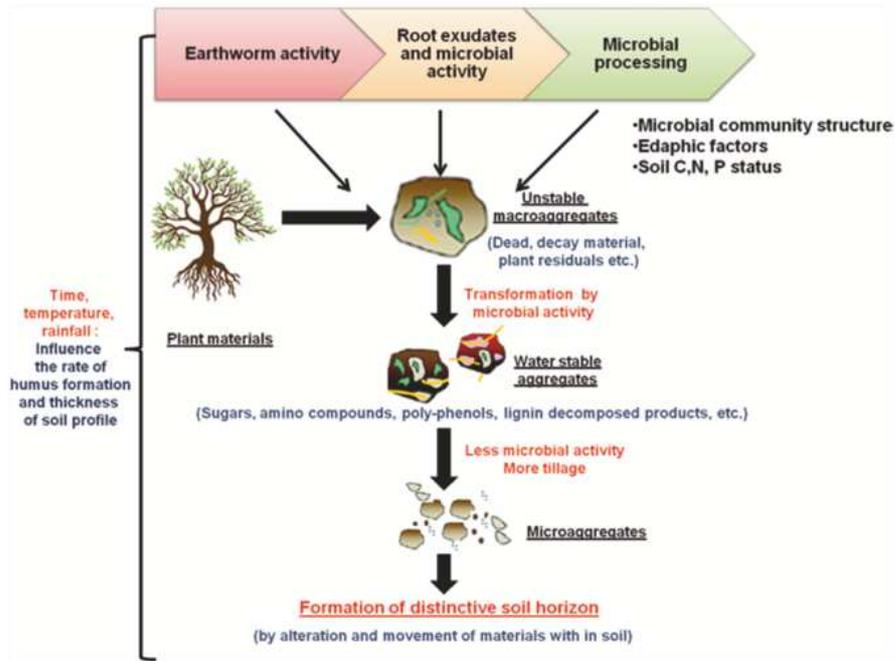


Figura 2.3 Schema rappresentativo, comprensivo dei principali attori (attività dei lombrichi e dei microrganismi, essudati radicali delle piante) e fattori (temperatura e precipitazioni) che influenzano il processo di macro e micro-aggregazione nel suolo (Varma e Choudhary, 2019).

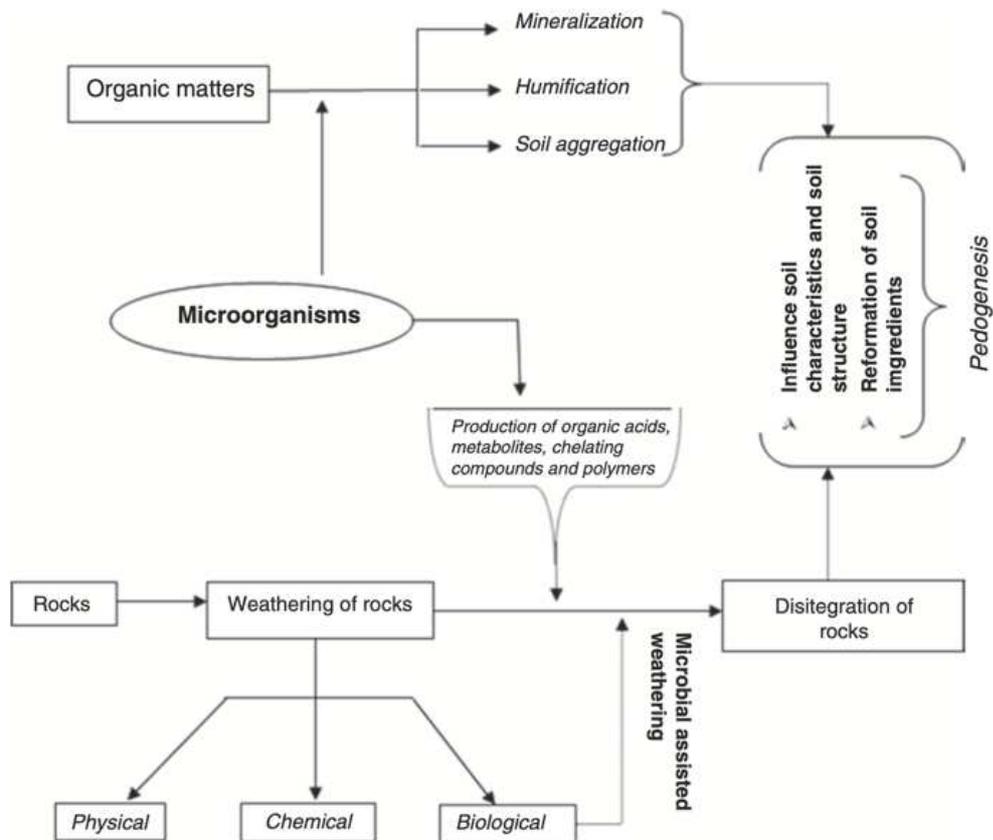


Figura 2.4 Fasi principali della degradazione della sostanza organica e dell'erosione della roccia madre in relazione all'azione dei microrganismi (Varma e Choudhary, 2019).

### 2.3 Studio del suolo da un punto di vista microbiologico tramite le analisi molecolari: *Real time qPCR*

Per comprendere, come nel nostro caso, la presenza e le dinamiche generate dai microrganismi nel suolo è opportuno applicare un approccio molecolare all'avanguardia, sempre più usato per campioni ambientali e in campo pedologico. L'insieme di queste tecniche molecolari risolvono uno dei più grandi limiti nello studio dei microrganismi, cioè la necessità di coltivarli in coltura pura (Fig. 2.5). Queste prevedono il campionamento di una porzione di suolo e l'estrazione e quantificazione del DNA.

Esistono due diverse tipologie di metodi di quantificazione del DNA: la prima è una quantificazione totale detta spettroscopica, che prevede una stima generale del DNA presente nel campione effettuata tramite un fluorometro; la seconda è una quantificazione di uno specifico tratto di DNA tramite la tecnica di *Polymerase Chain Reaction (PCR)* in un termociclatore. Quest'ultima metodologia è quella più interessante che ci permette di utilizzare diversi *primer* in grado di amplificare specifici geni, funzionali e non, utili a quantificare da un lato l'attività microbica in un dato processo biochimico dall'altro gli organismi di un determinato gruppo filogenetico (Fierer et al., 2015). La *PCR* viene effettuata con l'obiettivo di moltiplicare in modo esponenziale dei tratti di DNA, grazie all'utilizzo di specifici primer, ovvero brevi sequenze note di nucleotidi che innescano la reazione di replicazione del DNA.

Un ulteriore approfondimento dell'analisi molecolare è quella fornita dalle tecniche di sequenziamento di regioni sia altamente conservate sia ipervariabili (ad esempio il gene *rRNA 16s* o le regioni *Internal transcribed spacer (ITS)* dei geni ribosomiali) del genoma e la conseguente analisi filogenetica (che porta alla determinazione delle specie dei microrganismi nel suolo). Questa metodologia è però estremamente costosa e richiede spesso l'appoggio di laboratori esterni.

L'emancipazione dalla necessità di coltivare gli organismi in vitro ha concesso a queste tecniche di quantificazione tramite *PCR* diversi campi di applicazione. In questo campo sono state sviluppate la *kinetic PCR*, la *limiting dilution PCR* e la *competitive PCR*. Questo tipo di tecniche, seppure all'avanguardia, presentano diverse criticità. Le prime due metodologie si basano sulle misurazioni finali della quantità di DNA prodotto, il che rende difficile dedurre con precisione la concentrazione iniziale del DNA del campione. Nel caso della *competitive PCR* si presentano spesso problemi di affinità con i target (Hermansson e Lindgren, 2001).

Una tecnica diversa, la *Real time qPCR*, si basa sulla visualizzazione in tempo reale della amplificazione del tratto di DNA in questione grazie a molecole che, liberate durante l'amplificazione, reagiscono ed emanano fluorescenza. La quantificazione del DNA mediante *Real Time qPCR* si basa su misure ottenute durante la fase esponenziale iniziale, quando viene rilevata per la prima volta l'amplificazione del prodotto della *PCR*: la quantità del prodotto amplificato è proporzionale alla concentrazione del DNA bersaglio contenuto del campione (Hermansson e Lindgren, 2001).

Questa tecnica è più vantaggiosa rispetto alle precedenti: da un lato non prevede la necessità di manipolazioni post *PCR*, impedendo quindi sovracontaminazioni; dall'altro, a differenza della *competitive PCR*, rende la quantificazione del DNA molto più precisa e riproducibile. Si basa infatti su dei valori soglia (*threshold*), piuttosto che sulle misurazioni finali (Kabir et al., 2003).

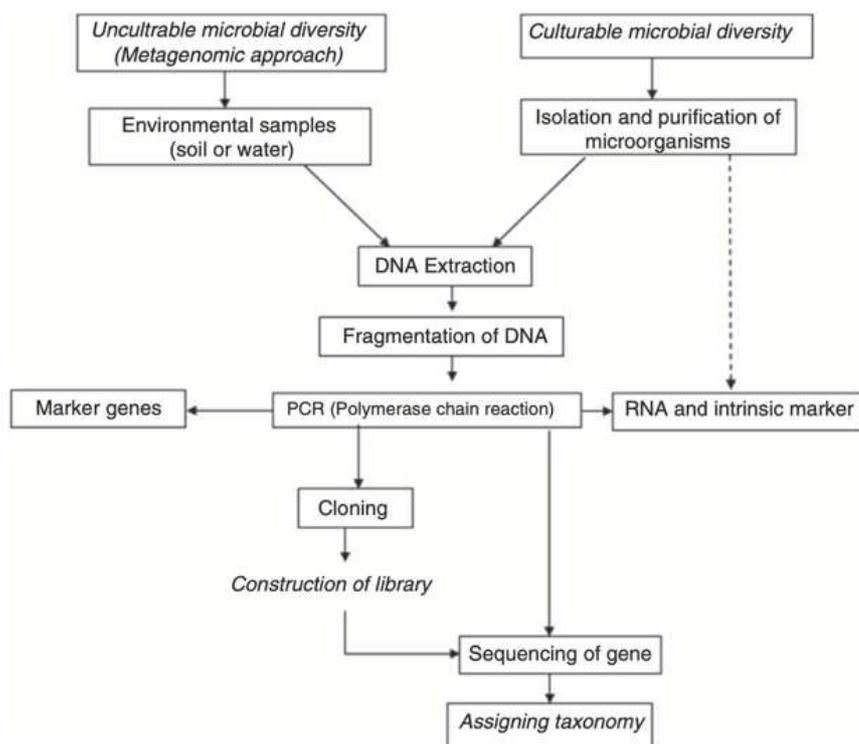


Figura 2.5 Varie tecniche di analisi molecolare per determinare la diversità microbiologica del suolo, sia per microrganismi riproducibili in coltura pura, sia per quelli impossibili da riprodurre in laboratorio (Varma e Choudhary 2019).

## 2.4 Funghi

I funghi sono organismi spesso pluricellulari che si sviluppano in miceli, hanno un optimum di pH più vasto rispetto ai batteri e sono in grado di assimilare sostanze più complesse grazie a una serie di enzimi (Rousk et al., 2010). Questi ultimi aspetti li rendono più competitivi e maggiormente presenti nel suolo, ma in condizioni di abbondanza di azoto i batteri possono essere altrettanto performanti (Schmidt et al., 2004).

Possiamo distinguerne due macrocategorie: i funghi micorrizici e i saprofiti. I primi sono importanti per la loro funzione di conduzione e di ausilio nei processi di assorbimento e nutrizione delle piante. I secondi rivestono un ruolo centrale nei processi di degradazione della lignina e delle cellulose, ma anche nell'ammonificazione e nell'immobilizzazione dell'azoto.

Il micelio degli organismi fungini è fondamentale nell'iter di aggregazione delle particelle di suolo e previene anche la mineralizzazione e il dilavamento dell'azoto. Le funzioni espletate da queste particolari strutture pluricellulari vengono conservate anche dopo la morte cellulare: la necromassa è infatti ancora in grado di redistribuire le sostanze nutritive riequilibrando i diversi micro-siti, rendendone più omogenea la fertilità e la ritenzione idrica (Staňková et al., 2015).

Anche il processo di umificazione è dominato da questi organismi che permettono il riciclo di sostanze estremamente recalcitranti alla decomposizione (lignina, cere, grassi, ecc.).

La formazione di sostanze umiche come acidi umici, umina e acidi fulvici, ad alto peso molecolare, aumenta la capacità di scambio cationico (CSC) e quindi la fertilità del suolo.

Per quantificare la presenza dei funghi si è utilizzata una coppia di primer (Fig. 2.6) che identificano e amplificano la regione di spaziatura *ITS2* all'interno del DNA ribosomiale (vedi paragrafo “Analisi del DNA”). A differenza dei batteri lo studio dei funghi tramite l'analisi della variazione della sequenza di nucleotidi all'interno del gene 18S, o delle regioni ITS, è più complicata e presenta alcune problematiche. Questi geni e i primer che li riconoscono hanno una scarsa specificità e possono incorrere nell'individuazione di geni non solo fungini, ma anche di piante o di altri eucarioti. La conseguenza è quindi quella di dover trattare i dati ottenuti con la dovuta cautela tenendo conto di questi aspetti (Anderson e Cairney, 2004).

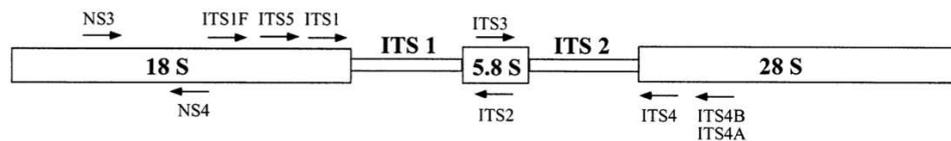


Figura 2.6 Rappresentazione schematica della regione di DNA fungino. I rettangoli rappresentano i geni ribosomiali, le frecce la posizione dei primer. Di particolare interesse sono le posizioni dell'*ITS2* e dell'*ITS3*, regioni spaziatrici anch'esse rappresentate (Larena et al., 1999).

## 2.5 Batteri

I batteri sono organismi che nel suolo ricoprono una massa più ridotta rispetto ai funghi, soprattutto a causa della loro natura unicellulare. Questi hanno funzioni legate all'immobilizzazione della SOM, al riciclo dell'azoto intracellulare, alla nitrificazione e denitrificazione ma anche alla fissazione dell'azoto atmosferico in azoto organico (unico processo di questo genere che avviene in natura). Si può affermare che questi, insieme agli archei, dominino le trasformazioni dell'azoto; è per questo opportuno approfondire il ciclo dell'elemento nel suo insieme (vedi paragrafo “Ciclo dell'azoto”).

I batteri, in generale, possono essere studiati tramite tecniche molecolari di amplificazione e sequenziamento del gene che codifica per la subunità ribosomiale *16S*. Questa contiene regioni conservate e ipervariabili, che ne consentono la classificazione filogenetica. Inoltre, l'abbondanza di alcune categorie di batteri può essere stimata attraverso la quantificazione di altri geni che codificano per importanti enzimi coinvolti, ad esempio, per alcune fasi del ciclo dell'azoto (Maretto et al., 2023).

Oltre a questi geni in questo lavoro è stata quantificata anche l'abbondanza del *gh48*, risorsa utile per studiare l'attività batterica cellulolitica. Questo gene a differenza di quelli riferiti al ciclo dell'azoto è presente nelle comunità batteriche che si occupano della degradazione della cellulosa e quindi inserite nel ciclo del carbonio. In particolare il *gh48*, codifica per una famiglia di proteine utilizzata da actinobatteri cellulolitici: le cellulasi. Questo tipo di enzimi sono in grado di degradare la cellulosa, sostanza insolubile che comprende circa metà della  $CO_2$  fissata dalle piante (de Menezes et al., 2015). Quantificare questi geni tramite *Real time qPCR* significa inquadrare la dinamica del ciclo del carbonio e può essere utile studiarlo in relazione al pH e all'abbondanza di azoto (Duan et al., 2020).

## 2.6 Ciclo dell'azoto

L'azoto è l'elemento più limitante nella crescita delle piante insieme all'acqua e alla luce, studiarne il ciclo è interessante per capire lo stato di salute del suolo e della vegetazione sovrastante (Wang e Fernandez, 1999).

Il ciclo dell'azoto è strettamente connesso al ciclo di altri nutrienti come il carbonio. Nel suolo l'elemento può trovarsi sia in forma organica che inorganica, ma anche legato ad esso sottoforma di ione ammonio o anione nitrato.

Queste dinamiche sono tra i processi più importanti nel suolo, in quanto sono collegati al dilavamento e all'inquinamento dei suoli a causa del nitrato, all'emissione di gas serra, all'acidificazione dei suoli e all'eutrofizzazione degli habitat umidi e acquatici (Laverman et al., 2001). Questo ciclo a livello globale è pesantemente condizionato dall'utilizzo di fertilizzanti e infatti l'impiego globale di azoto in ambito agricolo è aumentato da 12 Tg nel 1960 a 104 Tg nel 2010 con la consapevolezza che l'uso di N nel sistema alimentare aumenterà del 51% entro il 2050 (Zilio et al., 2020)

La lisciviazione dei nitrati, tra i processi più dannosi causati dall'impiego di fertilizzanti in agricoltura, può essere controllata dall'azione di alcuni microrganismi in grado di ridurre queste sostanze reattive nel gas inerte corrispondente N<sub>2</sub>.

I processi che interessano questo fondamentale nutriente sono riconducibili a tre fasi principali: la decomposizione, l'immobilizzazione e le reazioni di ossidoriduzione (nitrificazione, denitrificazione, DNRA ovvero ossidazione anaerobia dell'ammonio) (Staňková et al., 2015).

La decomposizione è un processo assimilabile alla ammonificazione, cioè il passaggio dalla SOM all'ammonio (Geisseler et al., 2010).

La seconda fase consiste invece nell'immobilizzazione microbiologica della biomassa: i rapidi cicli vitali e il metabolismo di questi organismi consentono di fissare l'azoto decomposto dalla SOM nella loro biomassa, che ben presto risulta morta, ma stabile nel suolo.

L'ultima fase del processo si divide in nitrificazione e denitrificazione. Sono due dinamiche opposte che avvengono in condizioni di diversa disponibilità di ossigeno.

La nitrificazione è una reazione di ossidazione che avviene in condizioni aerobiche e porta l'ammonio a diventare prima nitrito e poi nitrato. Questo processo libera quattro cationi idrogeno acidificando di conseguenza il suolo.

La denitrificazione è opposta alla precedente e avviene in condizioni anaerobiche. In assenza di ossigeno il nitrato diventa accettore di elettroni e si riduce in nitrito, alternativamente in ammonio attraverso la DNRA (*Dissimilative Nitrate Reduction to Ammonium*).

Questo ciclo è stato reinterpretato nel 2004 da Schimel e Bennett, aggiungendo una variabile. La SOM, infatti, può essere decomposta non necessariamente in modo diretto in ammonio, ma anche in monomeri organici (Fig. 2.9). Questi, come l'azoto minerale, possono essere utilizzati dalle piante e dai microrganismi e l'equilibrio di competizione tra questi due fruitori trofici è regolato dalla disponibilità di azoto (Fig. 2.7). In condizioni di scarsità dell'elemento piante e microrganismi entrano in competizione per l'assimilazione di monomeri organici, in caso contrario le piante prediligono l'N minerale e non entrano in competizione con batteri e archea (Schimel e Bennett, 2004). La disponibilità di azoto e carbonio, quindi il rapporto C/N è fondamentale nel regolare i processi sopra descritti, lo

schema che segue descrive perfettamente quattro casistiche in cui l'equilibrio tra queste reazioni varia in relazione alla disponibilità di azoto (Fig. 2.8).

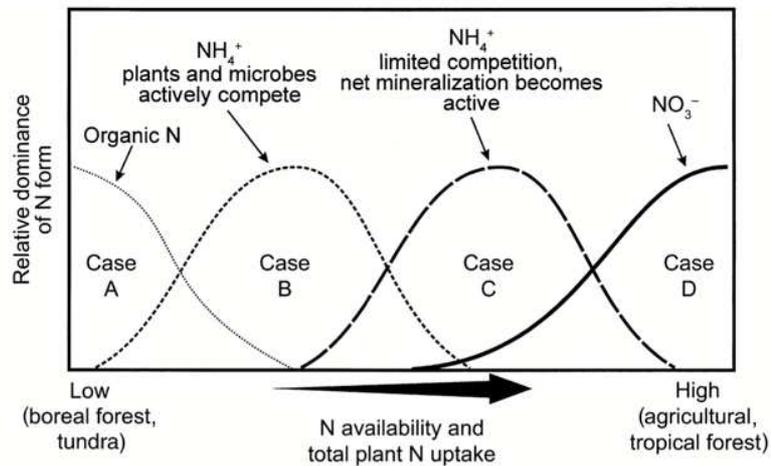


Figura 2.7 Variazione nell'interazione tra piante e microrganismi in relazione all'abbondanza di azoto nel suolo e alle sue forme chimiche (Staňková et al., 2015).

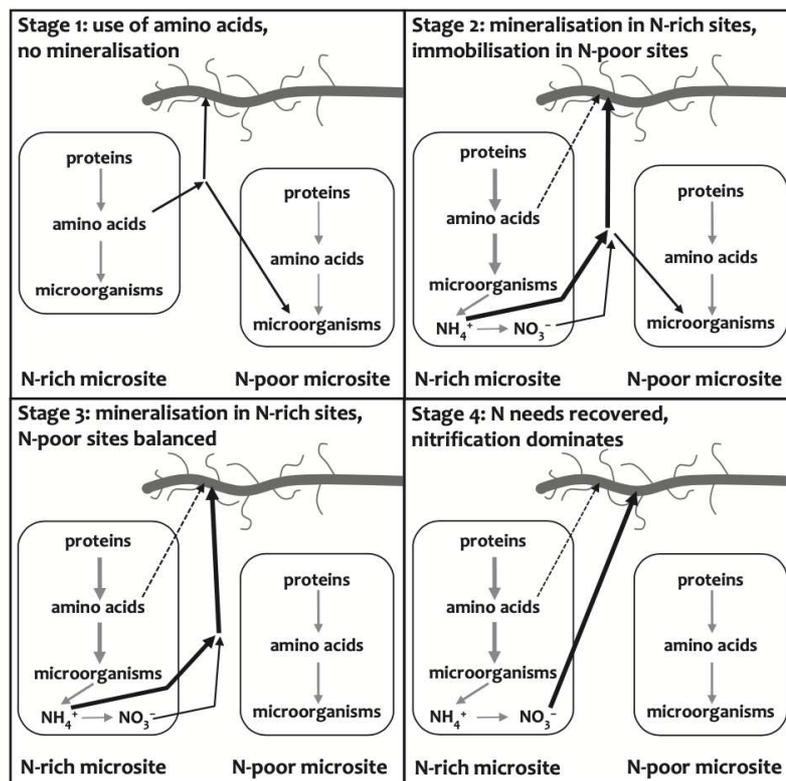


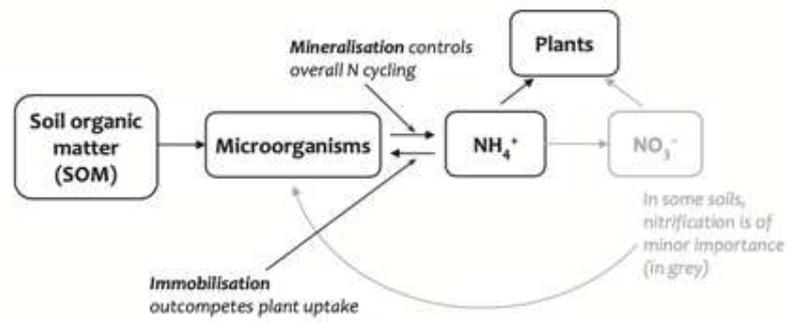
Figura 2.8 Variazioni nel ciclo dell'azoto e conseguenze sull'interazione tra microrganismi e piante al mutare della disponibilità di azoto.

Fase 1: In scarsità di azoto, l'N organico è depolimerizzato e gli aminoacidi dei monomeri sono direttamente immobilizzati senza che avvenga nessun processo di mineralizzazione. In questa fase gli aminoacidi sono la principale fonte di N sia per i microbi sia per le radici delle piante che entrano quindi in competizione.

Fase 2: Quando la disponibilità di N aumenta, nei micrositi ricchi di N l'eccesso di aminoacidi viene mineralizzato in ammonio e nitrato, piante e microbi li usano come fonte di azoto.

Fasi 3-4: All'aumentare della disponibilità di N, viene mineralizzata una quantità in eccesso di  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , che non essendo utilizzato da piante o da microrganismi può essere lisciviato dal suolo (Staňková et al., 2015).

### Classical N-saturation model (Aber et al. 1989, 1998)



### New paradigm (Schimel & Bennett 2004)

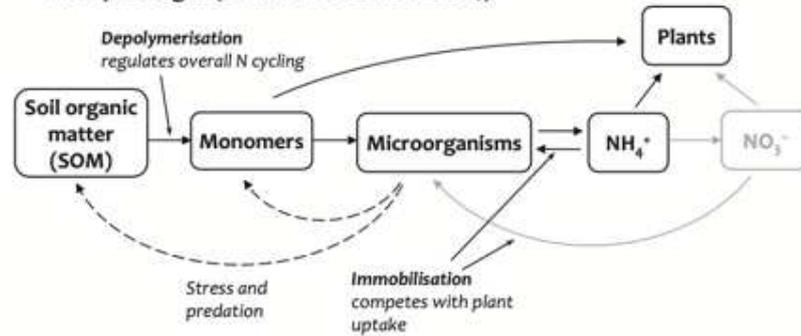


Figura 2.9 Confronto tra il modello tradizionale del ciclo dell'azoto (Aber et al., 1989) e il nuovo modello formulato da Schimel e Bennet nel 2004. Questo introduce i monomeri organici come prodotto parziale del processo, utilizzabili da piante e microrganismi in determinate condizioni di abbondanza di N (Staňková et al., 2015).

## 2.7 Il ciclo fase dopo fase: l'influenza delle comunità microbiche

Come già anticipato, i processi caratteristici del ciclo dell'azoto sono controllati sia da fattori ambientali, ma anche e soprattutto dai microrganismi. Questi ultimi, tramite specifici enzimi, guidano le trasformazioni principali riconducibili a questi sette principali passaggi (Fig. 2.10): assimilazione dell'azoto ridotto, nitrificazione, denitrificazione, ossidazione anaerobia dell'ammonio (*Anammox*), fissazione dell'N e la DNRA (*Dissimilatory N Reduction to Ammonium*) (Wang et al., 2022).

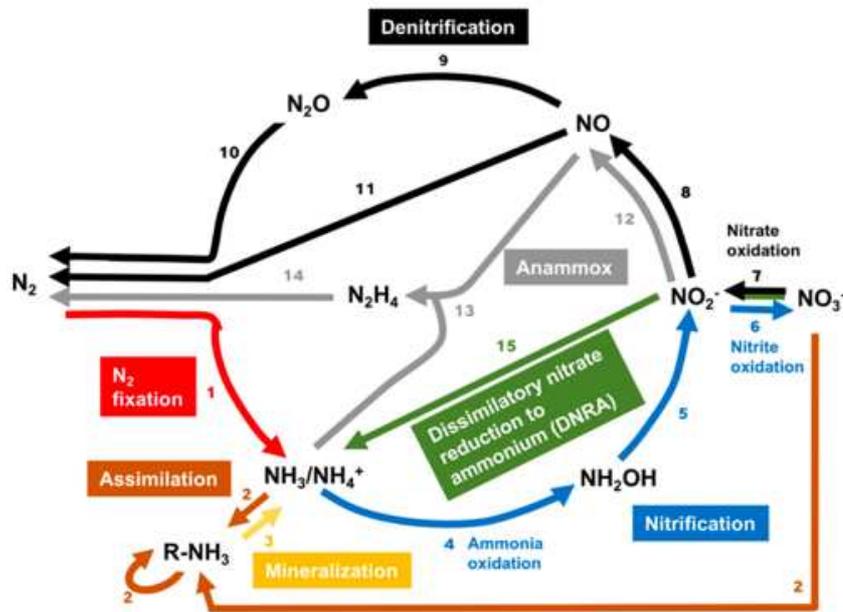
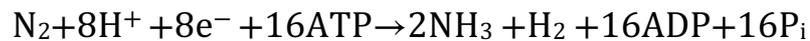


Figura 2.10 Schema riassuntivo dei passaggi fondamentali del ciclo dell'azoto che comprendono azotofissazione, assimilazione dell'azoto, mineralizzazione, nitrificazione, denitrificazione e i processi di *Anammox* e di *DNRA* (Zhang et al., 2020).

### 2.7.1 Fissazione dell'azoto



Reazione di fissazione dell'azoto per azione della Molibdeno-nitrogenasi (Seefeldt et al., 2009).

La fissazione dell'azoto, ad opera di alcune categorie di microrganismi, è l'unico processo biologico per la creazione dell'azoto fissato a partire da quello atmosferico.

Si riferisce al processo mediante il quale gruppi specializzati di procarioti chiamati "diazotrofi" o "fissatori N<sub>2</sub>", riducono il gas molecolare N<sub>2</sub> in ammoniaca, allo scopo di soddisfare i loro bisogni trofici.

Poiché il legame triplo dell'azoto molecolare è molto stabile e richiede molta energia per essere sciolto, gli organismi diazotrofi utilizzano un complesso metalloenzima ad alto peso molecolare e ricco di ferro. Questo, la nitrogenasi, insieme a quantità significative di ATP e di un riduttore, converte l'azoto N<sub>2</sub> in ammoniaca a condizioni ambientali. È interessante effettuare un paragone ecologico sulla diversità abissale di dispendio energetico: da un lato la necessità dalle industrie di raggiungere altissime temperature per la produzione di

fertilizzanti; dall'altra la capacità di un enzima complesso come la nitrogenasi di effettuare lo stesso processo a temperatura ambiente (Smil, 2004).

Tra i geni che codificano per la molibdeno-ferro-nitrogenasi troviamo il *nifH*. Questo gene e i primer che lo identificano nelle sequenze di DNA durante la qPCR, possono essere utilizzati per quantificare l'abbondanza di copie geniche che codificano per questo enzima e dei microrganismi associati come: *Azotobacter*, *Desulfovibrio*, *Trichodesmium*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Rhizobia* e *Frankia* (Zhang et al., 2020).

### 2.7.2 Assimilazione dell'azoto

Questo processo consiste nella produzione, da parte delle cellule, di molecole di azoto organico a partire da forme inorganiche e organiche. L'azoto, assorbito come ammonio dalle cellule di piante e microrganismi, viene incorporato negli amminoacidi dagli enzimi glutammino e glutammato sintetasi. L'assimilazione del nitrato è più costosa perché questo, prima di entrare nelle cellule, deve essere ridotto dalla nitrato e nitrito reductasi in ammonio. Questo maggiore costo metabolico influenza la preferenza delle piante nell'assimilazione dell'ammonio piuttosto che del nitrato in relazione all'abbondanza delle due specie chimiche nel suolo (cioè dal rapporto ammonio/nitrato) (Zhang et al., 2020).

### 2.7.3 Mineralizzazione

Durante questa fase l'azoto organico proveniente dalla biomassa viene rimineralizzato in ammonio e nitrato.

Di fatto questa fase è concettualmente sovrapponibile alla decomposizione della sostanza organica o meglio delle escrezioni degli organismi che vengono prodotte durante i processi di degradazione.

Durante questa fase del ciclo si può passare dall'Azoto Organico Particellato (PON) all'Azoto Organico Disciolto (DON) tramite processi di disintegrazione, solubilizzazione e rottura dei legami C-C. Successivamente si verifica la deaminazione degli amminoacidi con la conseguente liberazione di ammonio e altre sostanze organiche a basso peso molecolare che possono essere assimilate nuovamente dai microrganismi. Questo processo nel suolo è svolto da microrganismi come funghi e batteri, ma anche da macropedofauna come i lombrichi che rivestono un ruolo fondamentale nella disintegrazione della S.O (Zhang et al., 2020).

### 2.7.4 Nitrificazione

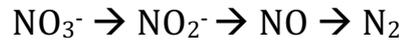
Il processo di nitrificazione prevede un'ossidazione dell'ammonio a nitrato tramite O<sub>2</sub>, mediato da specifici microrganismi nitrificanti: AOA (archea ammonio ossidanti) e AOB (batteri ammonio ossidanti) che usano l'ammonio come fonte di energia e di biomassa azotata (Staňková et al., 2015). Il primo passaggio che rende possibile l'ossidazione dell'ammonio in nitrito è quello dall'ammoniaca all'idrossilamina tramite l'enzima ammoniaca monossidasi. Questo enzima è codificato dai geni *amoA* (legato al sito attivo dell'enzima), *amoB* e *amoC*.

I generi di batteri responsabili di questi processi appartengono alla divisione dei *β-proteobacteria* e in particolare ai due generi *Nitrosospira* (più frequenti nel suolo) e *Nitrosomonas* (Mendum et al., 1999)

Esistono anche batteri come *Nitrobacter* e *Nitrospina* che ossidano il nitrito in nitrato.

Studiare l'attività microbica di questo processo può essere particolarmente importante: dal momento in cui l'N viene trasformato in nitrato non è più legato a microrganismi o a particelle del suolo ed è quindi molto suscettibile a dilavamento. Tra le conseguenze negative associate si osservano perdita di fertilità e inquinamento del suolo (Laverman et al., 2001).

### 2.7.5 Denitrificazione



*Reazione denitrificazione dell'azoto (Seefeldt et al., 2009)*

Riuscire a valutare l'entità dei processi di denitrificazione è particolarmente importante. Questo è infatti l'unico processo all'interno del suolo che trasforma forme reattive di azoto, spesso soggette a lisciviazione e causanti inquinamento, in azoto atmosferico  $\text{N}_2$  (Zilio et al., 2020).

La denitrificazione è un processo che può portare quindi a conseguenze importanti sull'ambiente e sugli ecosistemi sia di natura positiva che negativa. Positivamente con la riduzione di specie chimiche azotate reattive e inquinanti, ma negativamente favorendo spesso la liberazione di  $\text{N}_2\text{O}$  (gas serra) e la diminuzione della fertilità dei suoli.

Un modo per studiare l'entità di questo processo può essere quella di considerare i geni codificanti per alcuni enzimi che permettono le trasformazioni più importanti in questo processo (Fig. 2.11). Ad esempio, i geni *nirS* e *nirK* codificano per la nitrito reduttasi, responsabile della reazione che porta dall' $\text{NO}_2^-$  al NO. Il *nosZ*, che codifica invece per la ossido-nitroso reduttasi, è responsabile dell'ultimo passaggio da ossido nitroso ad azoto molecolare, fondamentale per impedire la liberazione in atmosfera del gas serra (Ma et al., 2019).

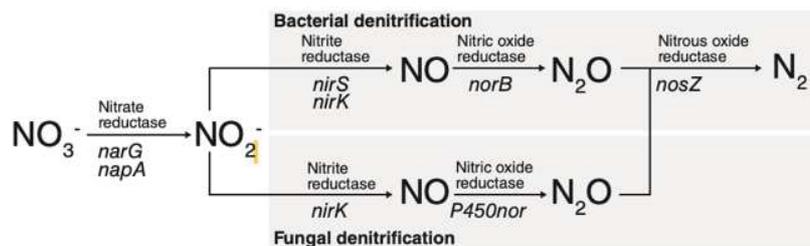


Figura 2.11 Via metabolica di denitrificazione in cui sono indicati gli enzimi chiave e i geni utili alla loro identificazione tramite i primer.

### 3. Obiettivi

Fatte queste necessarie introduzioni per comprendere la connessione tra suolo, vegetazione, microrganismi, principali processi che li coinvolgono e metodologie per studiarne l'attività e i processi regolati, è opportuno indicare gli obiettivi di questo lavoro. Consapevoli dell'interconnessione tra gli aspetti sopracitati, questa tesi ha come obiettivo quello di evidenziare, tramite indagini di natura chimica e microbiologica, le principali differenze riguardanti l'attività microbiologica di questi due diversi siti che differiscono per la loro copertura vegetale.

Ci si pone quindi come obiettivo quello di correlare parametri fondamentali come i valori di pH e il rapporto C/N, con i Ct (*Threshold cycle*) risultati dalle analisi *Real Time qPCR*, indici dell'attività microbica in diverse reazioni fondamentali che avvengono nel suolo. Si vogliono anche dimostrare le differenze, significative da un punto di vista statistico, dei valori dei Ct ottenuti dai vari primer in relazione alla diversa copertura forestale. È obiettivo di questo lavoro anche quello di sondare il divario tra orizzonti organici e minerali, separati opportunamente durante il campionamento. Sono infatti presenti diversi studi in cui si accerta l'eterogeneità dell'attività microbiologica che varia in relazione alla sostanza organica e ai livelli di pH di un certo substrato (Varma e Choudhary, 2019; Staňková et al., 2015). In particolare ci si aspetta un esubero di carica microbiologica nell'orizzonte organico, tipicamente più attivo per la sua maggiore quantità di S.O.

Ci si propone eventualmente, alla luce delle differenze e delle relazioni dimostrate tra i dati raccolti, di ipotizzare quale sia tra i due l'ecosistema in maggiore equilibrio nei suoi processi legati in particolare al ciclo dell'azoto.

## 4. Materiali e Metodi

### 4.1 Inquadramento stazionale

#### 4.1.1 Inquadramento morfologico-topografico

I campionamenti sono stati effettuati presso la località di passo Croce d'Aune nel comune di Pedavena a ridosso delle prime Dolomiti bellunesi. Secondo l'Atlante Climatico Del Veneto quest'area rientra nella comunità montana Feltrina, il documento dell'Arpav dichiara che questa: "ha una superficie di circa 605 km<sup>2</sup> e interessa il territorio di 13 Comuni. La quota media dell'area è di 830 m s.l.m. (variabili tra i 200 m ed i 2200m). L'area ha a settentrione le Vette Feltrine (Monte Pavone 2334 m) ed il gruppo del Cimonega (Sass de Mura 2550 m) mentre a sud si trovano le Prealpi ed in particolare il massiccio del Grappa (cima Grappa 1775 m) e le Prealpi Trevigiane (Monte Cesen 1570 m)" (Zanardo et al., 2016). I due siti campionati si trovano a ridosso della strada bianca che costeggia il sentiero 801 del CAI che parte da Passo Croce d'Aune e conduce fino al Rifugio dal Piaz. Nello specifico si trovano alle seguenti coordinate e altitudini:

Sito faggio: 46°04'22.4"N 11°50'31.9"E, altitudine 1287 m s.l.m.

Sito abete rosso: 46°04'18.6"N 11°50'30.2"E, altitudine 1370 m s.l.m.

È stata calcolata anche la pendenza percentuale, fattore topografico determinante in relazione ai processi pedogenetici specie se molto elevata, come in entrambe le aree esaminate: 55% nel faggio e 57% nell'abete rosso. Si riporta anche un inquadramento cartografico dell'area realizzato con QGIS (Fig. 4.6, 4.7 e 4.8).

#### 4.1.2 Inquadramento climatico

Secondo l'atlante il passo e i siti di campionamento ricadono nella fascia climatica fresca tra i 500 e 1400 m di quota. Questo riporta inoltre che: "L'analisi pluviometrica territoriale mostra che gli accumuli precipitativi più consistenti, intorno ai 1500 mm, si registrano nella parte nord-orientale dell'area, alle pendici delle Dolomiti. Accumuli inferiori, intorno ai 1300 mm, si riscontrano invece nella parte centro-occidentale dell'area". Di conseguenza la nostra area rientra nella porzione più piovosa, a confermarlo si fornisce il regime pluviometrico del comune di Feltre (Tab 4.1 e Fig. 4.1), ricavato dai dati Arpav (Barbi et al., 2013), con una precipitazione media annua di 1588 mm.

Tabella 4.1 Regime pluviometrico Feltre (BL).

Mesi	Piuvosità (mm)
GEN	77
FEB	82
MAR	98
APR	132
MAG	153
GIU	122
LUG	114
AGO	131
SET	137
OTT	178
NOV	260
DIC	125
ANNUI	1588

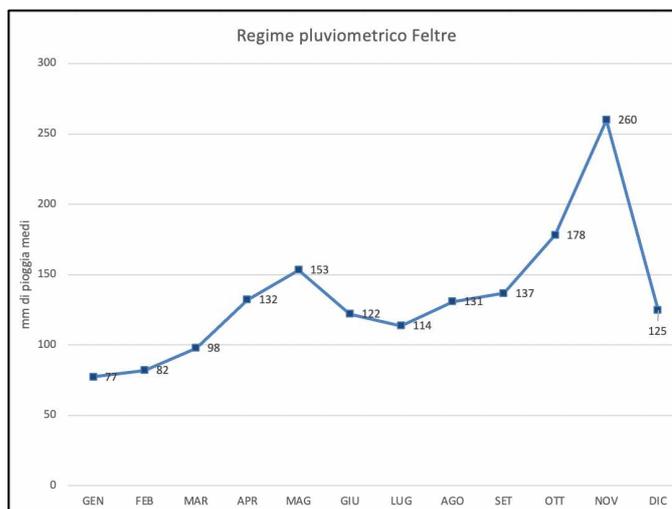


Figura 4.1 Grafico regime pluviometrico Feltre (BL).

Il documento prosegue “L’analisi termica territoriale evidenzia che le temperature medie annue all’interno dell’area variano fra i 2.5 °C e 12 °C, con un gradiente termico medio annuo di 0.53 °C / 100 m.” Per ricavare le temperature medie dei nostri siti si è proceduto sommando il gradiente a partire dall’area geografica fornita di dati più prossima alle stazioni (Pedavena, BL). Le temperature massime e minime medie annuali per i due siti sono rispettivamente 1,7°C e 11°C per il faggio e 1,3°C e 10,6°C per l’abete rosso (Fig. 4.1 e 4.2).

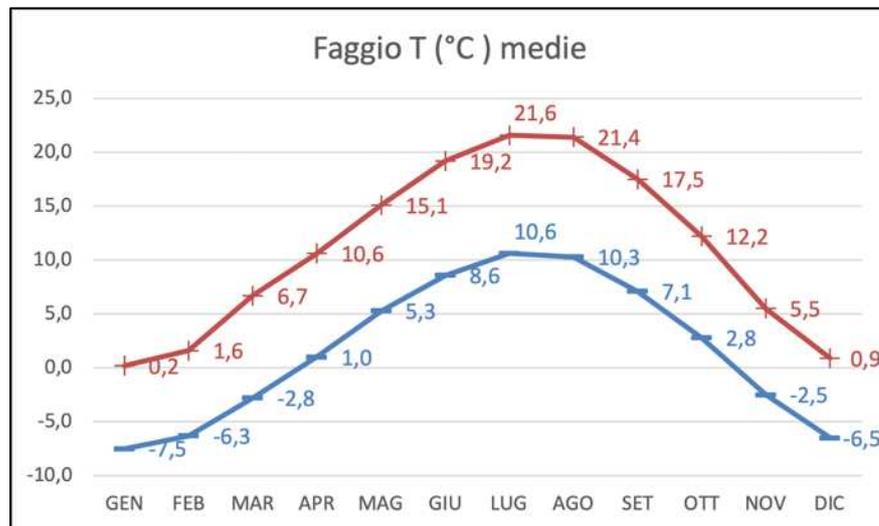


Figura 4.2 Grafico che rappresenta le temperature massime (in rosso) e le minime (in blu) medie mensili per il sito del faggio.

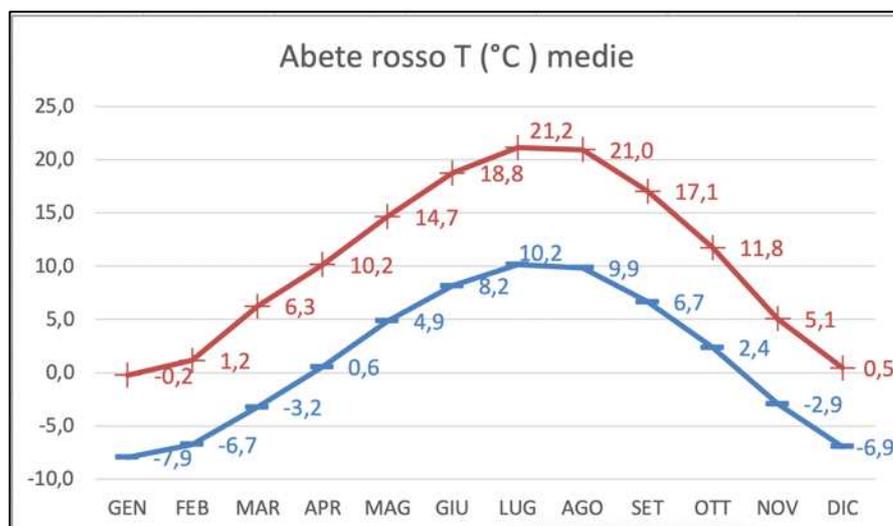


Figura 4.3 Grafico che rappresenta le temperature massime (in rosso) e le minime (in blu) medie mensili per il sito dell’abete rosso.

### 4.1.3 Inquadramento pedologico

La carta pedologica, ricavata dal Geoportale della regione del Veneto, è stata elaborata con QGIS per localizzare l'unità territoriale di riferimento descritta dalle seguenti diciture (Regione Veneto: Arpav):

Alla voce L1 si trova la dicitura “Alpi meridionali” che si riferisce alla localizzazione della unità pedologica.

La voce L2 riporta: “Medi e bassi versanti dei rilievi alpini, ripidi e con diffuse coperture glaciali, su rocce appartenenti alla successione stratigrafica calcarea e terrigena dolomitica”.

La L3: “Suoli formati da litotipi carbonatici moderatamente competenti, su superfici acclivi e/o soggette a fenomeni erosivi, di medi e bassi versanti di catene montuose principali e secondarie, a media energia del rilievo, con depositi glaciali e di versante”.

La L4: “Versanti con vallecole ad alta pendenza, stabili, modellati su calcari marnosi e nelle fasce submontana e montana con dominanti piceo-faggeti”.

Da queste tre brevi descrizioni emerge la riscontrata e notevole pendenza dei versanti, ma anche la presenza di rocce affioranti di matrice carbonatica e persino i riferimenti alla vegetazione perfettamente coerenti rispetto a quanto individuato.

Secondo il codice PED1 riportato alla voce “uts1” sulla carta dei suoli, il sito rientra nella categoria di suoli classificata come “*Typic Hapludalfs fine, mixed, mesic*” secondo la USDA (classificazione del dipartimento dell'agricoltura degli Stati Uniti) e come “*Albic Cutanic Luvisols (Humic, Hypereutric, Clayic)*” secondo la WRB (*World Reference Base for Soil Resources*).

La carta dei suoli fornisce anche una breve descrizione del profilo, in particolare restituendo la presenza di orizzonte A-BE-Bt-C profondo con grande contenuto di S.O. in superficie. La tessitura definita “moderatamente fine” manifesta la presenza di uno scheletro frequente e non calcareo che contribuisce a garantire un buon drenaggio del substrato. In questi suoli pendenti, secondo la carta, l'erosione si limita agli strati più superficiali e organici (Garlato et al., 2019).

### 4.1.4 Inquadramento vegetazionale

Per ciascuna area è stata determinata in percentuale l'abbondanza di copertura arborea, arbustiva ed erbacea, esaminando poi nello specifico le specie presenti in ciascuna categoria. Queste percentuali sono state determinate in una spedizione successiva (30/08/2023) per cogliere il pieno sviluppo anche della vegetazione erbacea.

Nel sito a faggeta vegetazione:

Arborea: 99% (di cui 98% *Fagus sylvatica* L. e 2% *Picea abies* L.)

Arbustiva: assente

Erbacea: 1% (di cui 100% *Helleborus niger* L.)

Nel sito a pecceta:

Arborea 95% (di cui 98% *Picea abies* L., 1% *Fagus sylvatica* L., 1% *Sorbus Aria* L.)

Arbustiva: di cui (30% *Corylus avellana* L. e 70% *Rubus idaeus* L.)

Erbacea: assente (in zone di chiara o di limite del popolamento presenza di *Rosa* spp. e di *Sesleria cerulea* L.)

Grazie al prodromo della vegetazione italiana, i due siti in questione sono stati fatti rientrare nell'alleanza *Aremonio agrimonioidis-Fagion sylvaticae* (Horvat) Borhidi in Török, Podani & Borhidi 1989. Nella scheda di questa alleanza vegetazionale viene riportata la *Anemone trifoliae-Fago sylvaticae sigmetum*, inquadrata come la serie prealpina orientale basifila del faggio e dell'abete rosso. Tra le specie diagnostiche di questa alleanza troviamo ovviamente faggio e abete rosso, ma anche specie erbacee individuate in sito come l'*Helleborus niger* L.

Nella sezione dedicata all'ecologia di questa alleanza la pagina web riporta: "Le comunità afferenti a questa alleanza presentano una grande varietà ecologica. Sono rinvenute a quote di circa 120-150 m nel caso di boschi mesofili e subtermofili delle pianure alluvionali illiriche fino a quote di circa 1.800 m per le faggete microterme centro-appenniniche e balcaniche. Le precipitazioni annuali sono comprese tra 650-2.000 mm (eccezionalmente fino a 4.000 mm). Si rilevano nei piani bioclimatici orotemperato, supratemperato superiore, supratemperato inferiore. Tali formazioni si rinvergono sia su substrati calcarei sia silicei o marnosi" (Prodromo della Vegetazione d'Italia).

#### **4.1.5 Inquadramento dendrometrico-forestale**

Le due aree di studio sono state studiate anche da un punto di vista prettamente dendrometrico-forestale. In particolare, per ciascuna area sono state effettuate due aree di saggio circolari di raggio 10 m, all'interno di queste è stato effettuato un cavallettamento totale degli individui, scegliendo una soglia di 7,5 cm. Questo perché il sito dell'abete presenta un grande numero di soggetti morti e di piccole dimensioni di cui è importante considerare la presenza. Nella pecceta la mortalità elevata, essendo riferita a diametri ridotti, può essere considerata sintomo di mancati diradamenti preventivi all'avvento della mortalità naturale.

Oltre al cavallettamento totale effettuato nelle modalità sopra citate, è stato effettuato anche un rilievo delle altezze, circa due per classe diametrica, nell'ottica di comprendere la fertilità del sito e di disegnare la curva ipsometrica, estrapolandone l'equazione poi utilizzata per il calcolo dell'altezza media a partire dal diametro medio. Sono infatti state calcolate successivamente densità del popolamento, area basimetrica, area basimetrica media, diametro medio e altezza media.

È stato inoltre tracciato un transetto di dieci aree di 1 m<sup>2</sup>, lungo il raggio delle aree di saggio, per stabilire lo stato di rinnovazione contando il numero di plantule presenti.

Questi parametri, estesi opportunamente all'ettaro, sono importanti per inquadrare i popolamenti e renderli confrontabili ad altri contesti forestali.

Sono state studiate anche la copertura delle chiome espressa qualitativamente e in percentuale, la struttura verticale e orizzontale, lo stadio evolutivo, il poligono delle frequenze, la forma di governo e l'origine del soprassuolo.

Tutte queste informazioni vengono riportate nelle schede di seguito che caratterizzano il sito della faggeta e quello della pecceta.

Un altro dato interessante può essere quello fornito dall'Atlante climatico del Veneto riguardo alla produttività forestale del territorio, descritta con l'indice di Paterson e compresa fra 7.5 t/ha l'anno riscontrati nelle aree intorno ai 200 m, e alle 4 t/ha, nelle aree prossime ai 2000 m, in cui i popolamenti sono limitati soprattutto dalle basse temperature (Barbi et al., 2013)

## Sito: Faggio

**Origine del soprassuolo e forma di governo:** Ceduo matricinato degradato.

**Stadio evolutivo:** Ceduo in una fase degradata con scarsa capacità pollonifera, con matricine di grosse dimensioni.

**Struttura orizzontale:** Le piante risultano disposte a gruppi, sono riconoscibili le ceppaie da cui nascono i fusti di origine agamica.

**Poligono delle frequenze e struttura delle età:** come è visibile dalla struttura del poligono delle frequenze, si tratta di un popolamento disetaneiforme in cui i fusti delle ceppaie hanno diametri diversi tra loro e dalle matricine (Fig. 4.4).

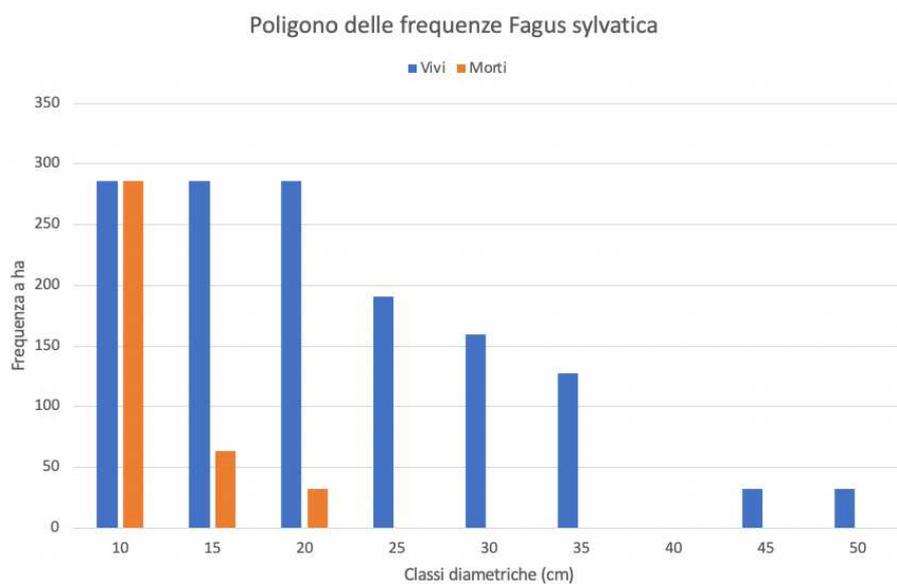


Figura 4.4 Diagramma a barre che rappresenta la distribuzione dei diametri estesa a ettaro delle piante vive e morte nel popolamento di faggio. In questo caso si può apprezzare la “reverse j slope”, curva tipica dei popolamenti disetanei.

**Grado di copertura delle chiome:** 60% Normale (le chiome sono ben distribuite nello spazio, senza spazi liberi).

**Stato della rinnovazione:** Assente, in nessuna delle aree di saggio sono state rinvenute plantule, nonostante sia stata identificata l’abbondante presenza di semi e frutti (faggiole).

**Densità del popolamento:** 1528 piante a ettaro con la soglia di cavallettamento di 7,5 cm, 923 con quella di 17,5 cm.

**Area basimetrica** 63,3 m<sup>2</sup> ettaro con la soglia di cavallettamento di 7,5 cm, 54,4 m<sup>2</sup> con quella di 17,5 cm.

**Diametro medio:** 22 cm

**Altezza media:** 20 m

**Necromassa:** 5 % in area basimetrica e 18% in frequenza.

## Sito: Abete rosso

**Origine del soprassuolo e forma di governo:** Fustaia coetanea artificiale.

**Stadio evolutivo:** Fustaia (diametri che superano la classe del 20).

**Struttura orizzontale:** Le piante risultano disposte in modo regolare, sono riconoscibili dei filari (rinnovazione artificiale).

**Poligono delle frequenze e struttura delle età:** come è visibile dalla classica struttura a campana del poligono delle frequenze si tratta di un popolamento coetaneiforme la cui struttura verticale è tipicamente monopiana (Fig. 4.5).

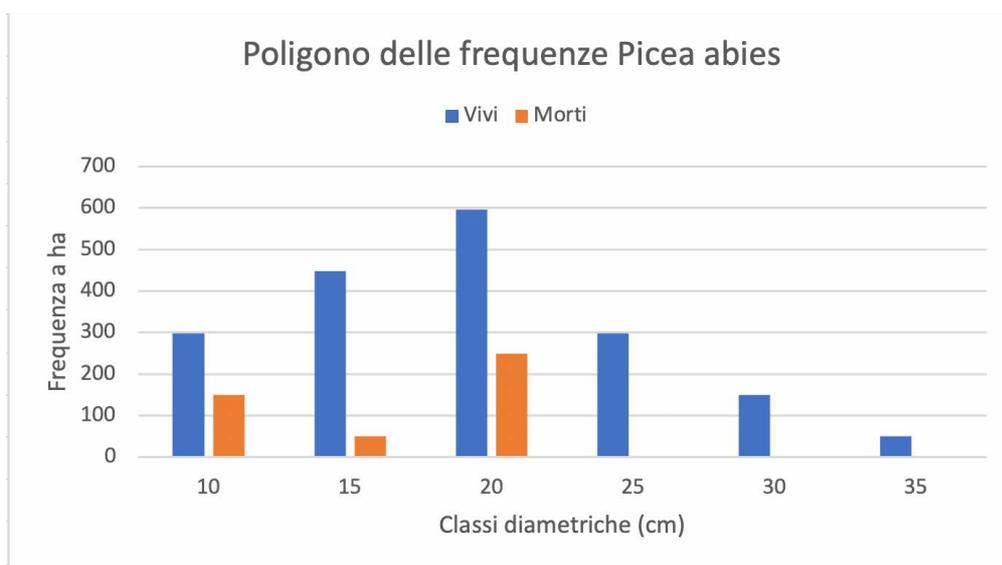


Figura 4.5 Diagramma a barre che rappresenta la distribuzione dei diametri estesa a ettaro delle piante vive e morte nel popolamento di abete rosso. È ben visibile la curva Gaussiana tipica dei popolamenti coetanei.

**Grado di copertura delle chiome:** 70% Colma (le chiome si toccano).

**Stato della rinnovazione:** Assente, in nessuna delle aree di saggio sono state rinvenute piantule.

**Densità del popolamento:** 1840 piante a ettaro con la soglia di cavallettamento di 7,5 cm, 1094 con quella di 17,5 cm.

**Area basimetrica** 57,1 m<sup>2</sup> ettaro con la soglia di cavallettamento di 7,5 cm, 47,3 m<sup>2</sup> con quella di 17,5 cm.

**Diametro medio:** 20 cm

**Altezza media:** 15 m

**Necromassa:** 14 % in area basimetrica e 24% in frequenza.

Figura 4.6 Inquadramento topografico effettuato tramite l'utilizzo di Google Satellite nel software QGIS per individuare geograficamente (in doppia scala) i siti di campionamento.

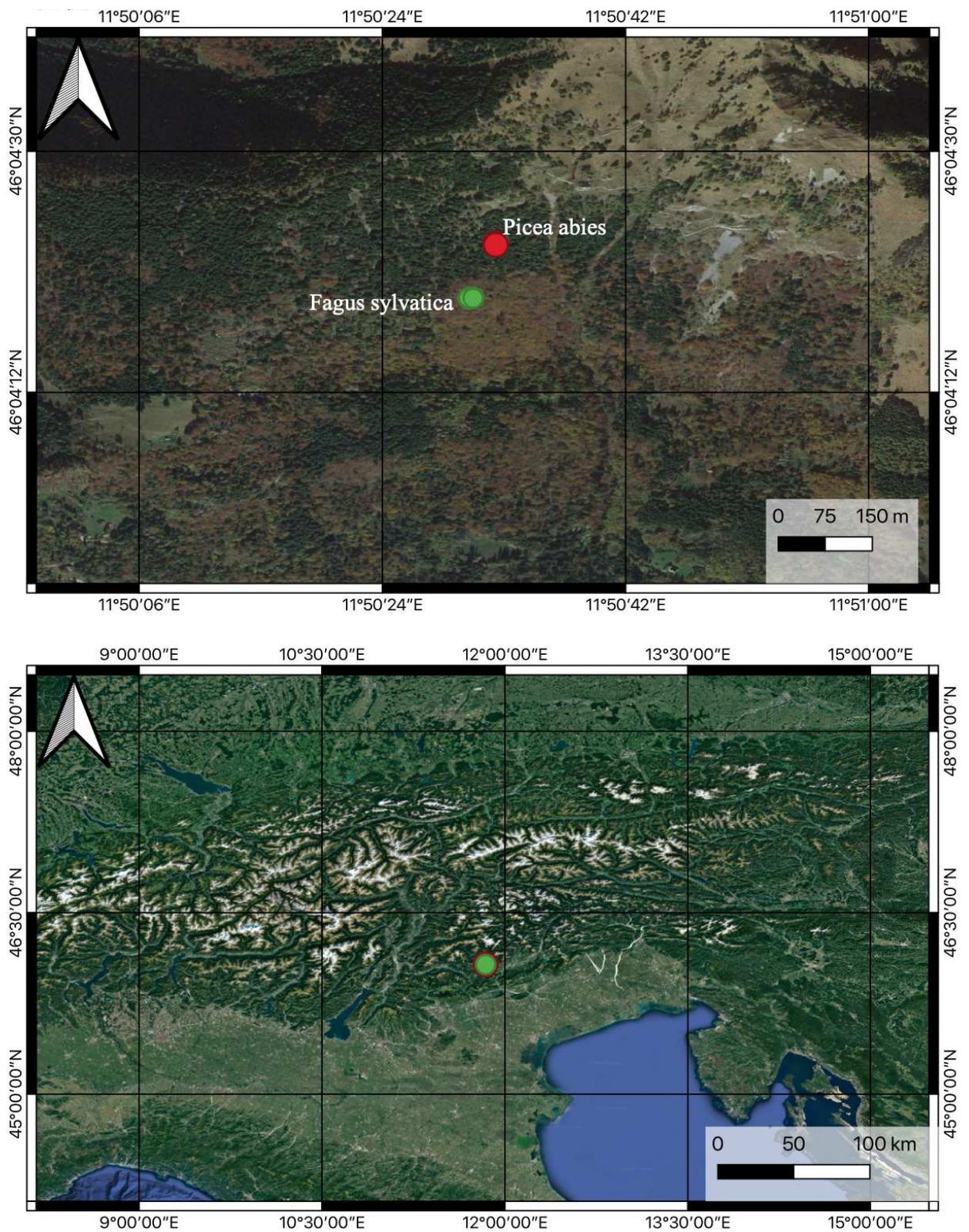


Figura 4.7 Inquadramento vegetazionale effettuato grazie alla carta delle categorie forestali ottenuta dal sito del Geoportale della Regione Veneto (<https://idt2.regione.veneto.it>).

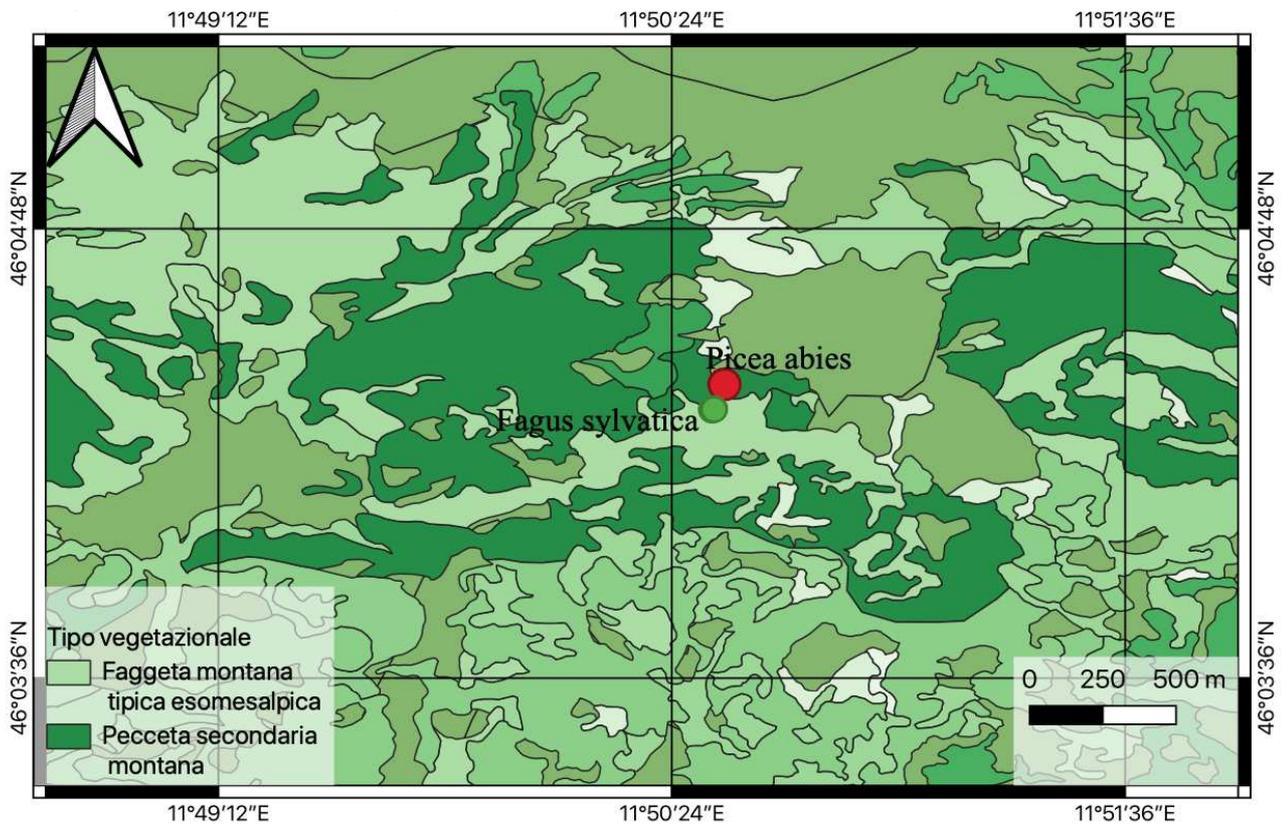
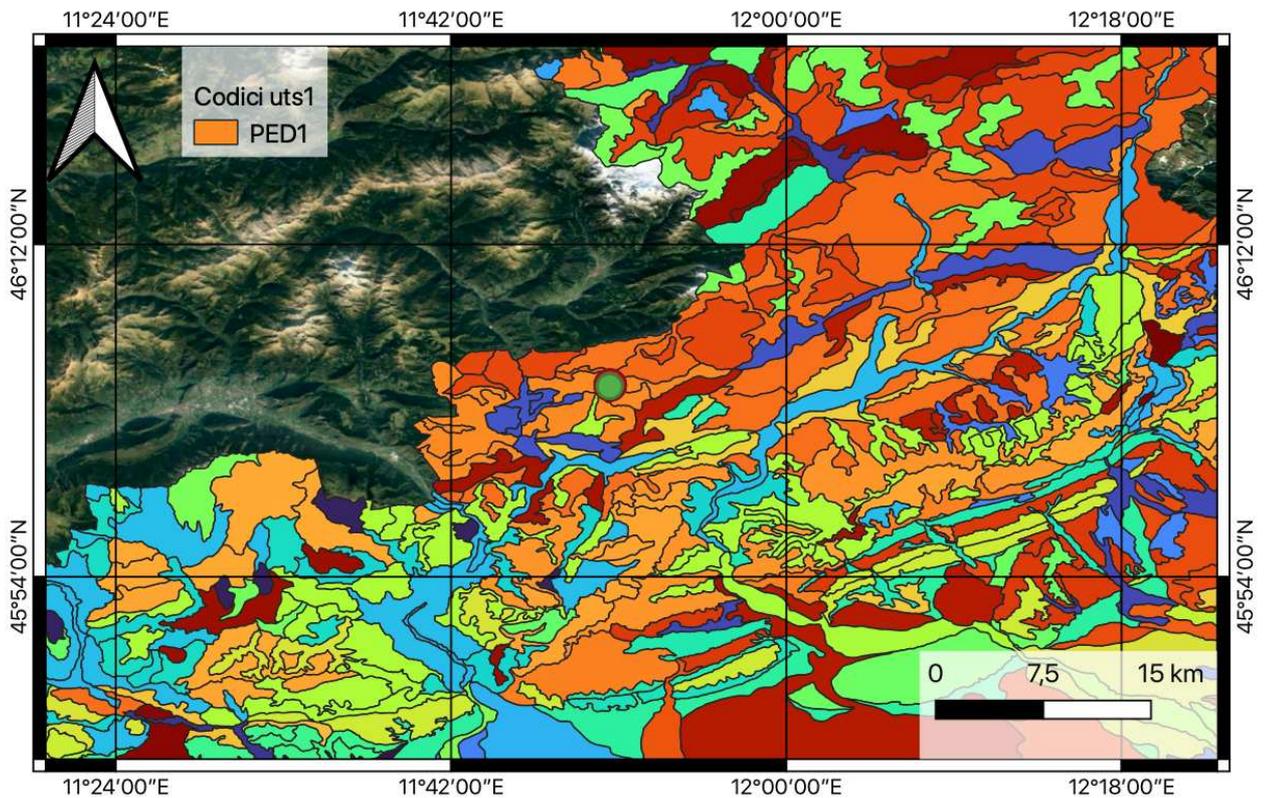


Figura 4.8 Inquadramento pedologico effettuato grazie alle Carta dei suoli del Veneto, ottenuta dal sito del Geoportale della Regione Veneto (<https://idt2.regione.veneto.it>).



## 4.2 Campionamento

La variazione delle condizioni chimiche e biologiche nei popolamenti forestali è particolarmente marcata sia in relazione allo spazio, verticale e orizzontale, ma anche in relazione alla stagione a seconda ad esempio della velocità di decomposizione della sostanza organica. Per questo motivo è tra le altre cose essenziale citare la data dei rilievi, che nel nostro caso sono avvenuti il 28/05/2023.

Le aree di campionamento sono state individuate in modo che all'interno di queste fossero omogenee l'aspetto fisico del suolo, i materiali presenti in superficie (tra cui la vegetazione), la forma di governo del popolamento forestale e interventi selvicolturali passati.

Dal momento che si intendeva effettuare un'analisi diagnostica comparativa, sia di aspetti chimici che biologici, sono stati campionati due siti con diversa copertura vegetale: una faggeta e una pecceta. In ciascuno di questi si sono scavate dieci piccole buche tramite una vanga, poiché l'utilizzo della sonda (trivella) era incompatibile con l'abbondante presenza di scheletro e radici che rendevano il suolo particolarmente compatto. La distribuzione di queste è stata casuale, cioè si sono scelte posizioni che si avvicinassero il più possibile alla media del sito, presumibilmente omogeneo, evitando preconcetti e scegliendole in maniera il più possibile oggettiva (Metodi di analisi chimica del suolo, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, 2000).

Per il campionamento sono stati selezionati punti di rilevamento che fossero rappresentativi dell'area considerata evitando sia impluvi ed espluvi, dove prevalgono rispettivamente accumulo ed erosione, sia l'eccessiva prossimità a strade e sentieri, ma anche le zone ecotonali di transizione.

Nei punti di prelievo scelti, che rispettassero questi criteri, sono state scavate delle aperture nel terreno di tipo "speditivo", cioè utili a prelevare nel nostro caso unicamente la porzione organica e parte dell'orizzonte organico-minerale A. Pertanto, è stato sufficiente aprire una buca di dimensioni utili a riconoscere questi due orizzonti (Zanella et al., 2001, p. 70).

Per avere una ulteriore possibilità di confronto anche all'interno delle due aree designate, si è deciso di separare gli orizzonti organici (lettiera nuova esclusa) e gli orizzonti minerali per ogni replica.

Al termine della giornata in bosco i campioni ottenuti sono stati quaranta di cui dieci organici e dieci minerali sia per il faggio che per l'abete rosso.

### 4.2.1 Distinzione degli orizzonti

Sono stati prelevati separatamente l'orizzonte chiamato "organico", comprensivo di OF e OH, e l'orizzonte minerale A. Per poterli prelevare separatamente e inserirli nei sacchetti di plastica è stato necessario distinguerli in campo, è opportuno quindi dedicare a loro un piccolo excursus.

Gli orizzonti organici sono divisibili in tre tipologie principale l'OL, l'OF e l'OH.

L'OL, sovrapponibile al concetto di lettiera presenta foglie intere o debolmente frammentate.

Questo si divide a sua volta in:

-OLn (nuovo) che corrisponde alla lettiera dell'anno

-OLv (vecchio) che è composto da foglie il cui colore è cambiato, a manifestare l'avvento dell'azione della macro e meso fauna (specialmente dei funghi saprofiti)

-OLt (di transizione) che presenta invece una grande quantità di organismi, tra cui anche i lombrichi che svolgono un ruolo fondamentale nello sfaldamento della S.O.

Dell'OF si definisce per convenzione la composizione: un 30% di S.O. grossolana e riconoscibile e un 70% di S.O. fine. Questo come l'orizzonte precedente si distingue in:

-Off (di frammentazione), che viene spesso confuso con l'OLv per la presenza di miceli e residui legnosi, è però distinguibile grazie alla presenza di S.O. fine

-OFr (residuo) che ha una minore quantità di S.O. fine

-OFm (misto) che ha residui vegetali più frammentati

L'OH supera il 70% di sostanza organica fine e durante il suo riconoscimento è importante distinguere eventuali porzioni di materia organica grossolana dalle radichette delle piante che possono invece trarre in inganno. Anche questo terzo orizzonte diagnostico è separato in:

-Ohr (residuo) che è appunto più ricco di residui riconoscibili ha quindi un 70-80% di sostanza fine

-OHf (fine) che è composto da una percentuale di sostanza fine superiore al 90%.

Se si parla invece di orizzonti minerali il primo che si incontra è l'orizzonte A. Questo in realtà è uno strato del suolo in cui si unisce la porzione minerale alla porzione organica del suolo e le modalità in cui queste due fasi interagiscono definiscono le diverse tipologie di orizzonte A.

L'orizzonte A biomacrostrutturato che prevede la formazione di complessi argillo-umici cioè strutture di forte aggregazione tra componente minerale e organica. Questa condizione di mescolamento è resa possibile anche grazie all'attività degli anellidi.

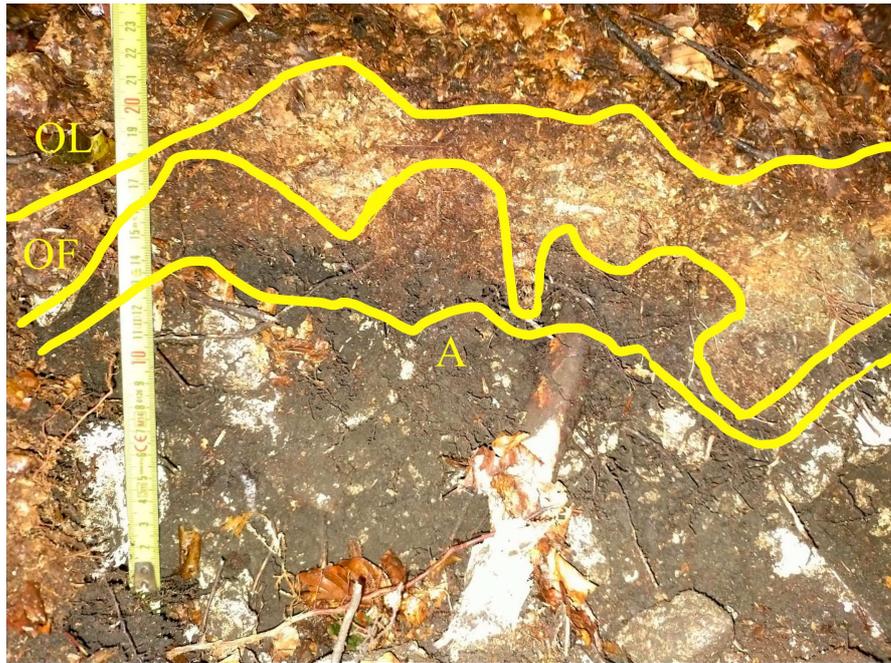
Nell'orizzonte A di insolubilizzazione si ritrova una struttura microgrumosa con aggregati di 3-5 mm. Questa è tipica di luoghi in cui l'attività della pedofauna è scarsa, mentre proliferano gli organismi fungini e l'umina, prodotto del loro metabolismo, risulta accumulata e insolubile.

L'orizzonte A di giustapposizione è uno strato del suolo in cui la componente organica e quella minerale sono separate tra loro e unicamente poste una sull'altra. In questa situazione pedologica gli elementi e le sostanze organiche sono spesso soggetti a dilavamento e migrano verso il basso.

In suoli particolarmente acidi può accadere che sia assente l'orizzonte A e al suo posto si ritrovi l'orizzonte eluviale E grigiastro (Zanella et al., 2001, p. 79-98).

È sempre complesso conciliare la classificazione teorica degli orizzonti e delle forme di humus con la complessa realtà delle situazioni in campo.

Vengono riportate due immagini in cui si individuano nelle due casistiche alcuni degli orizzonti sopra citati (Fig. 4.9 e 4.10).



*Figura 4.9 Profilo del suolo nel sito della faggeta. Sono apprezzabili i diversi orizzonti distinguibili dalla quantità di materiale organico e dalla diversa colorazione. È visibile anche la tipica colorazione chiara delle foglie che si stanno degradando.*



*Figura 4.10 Profilo del suolo nel sito della pecceta. Sono apprezzabili i diversi orizzonti distinguibili dalla quantità di materiale organico e dalla diversa colorazione.*

### **4.3 Analisi DNA**

I campioni sono stati trasferiti dai sacchetti di plastica in alcune vaschette in alluminio per facilitarne il disseccamento, distanziate tra loro per evitare la contaminazione.

#### **4.3.1 Pesa**

Dopo due settimane, i suoli sono stati uno ad uno frantumati grazie all'aiuto di un pestello e filtrati in un setaccio con maglie di 0,5 mm.

Si è poi proceduto col pesare i campioni: sono stati prelevati 250 mg di ogni campione necessari all'estrazione del DNA. Tutti i passaggi effettuati fino a questo punto si sono svolti con particolare accuratezza nell'ottica di limitare la contaminazione dei suoli pulendo ogni volta pestello e spatole con etanolo e autoclavando gli strumenti nel passaggio dai campioni di faggio a quelli di abete rosso.

#### **4.3.2 Estrazione**

L'estrazione vera e propria dei campioni è avvenuta tramite l'utilizzo del DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Germany), che è particolarmente performante anche per suoli superficiali, lettiere forestali e compost.

Il kit prevede diverse fasi descritte dal protocollo dell'azienda produttrice:

I campioni di terreno vengono sottoposti a lisi mediante omogeneizzazione chimica e meccanica. Il buffer per la lisi viene aggiunto a una provetta mista di perle di zirconio contenente il campione. La lisi del campione, funzionale al rilascio di DNA fungino e batterico, è stata effettuata tramite un TissueLyser (Qiagen, Germany) per dieci minuti. Il lisato grezzo viene quindi sottoposto a rimozione degli inibitori grazie ad una pulizia tramite alcuni reagenti che vengono sistematicamente centrifugati. Dopo la pulizia, il lisato purificato viene miscelato con un volume uguale di soluzione di legame del DNA e fatto passare attraverso una membrana filtrante in colonnine apposite. La membrana viene lavata con un regime di lavaggio in due fasi. Il DNA legato alla silice viene quindi eluito utilizzando un tampone di eluizione (sito web: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

#### **4.3.3 Quantificazione Qubit**

Per verificare l'esito positivo dell'estrazione i campioni di DNA sono stati quantificati tramite la "*Qubit fluorescence quantification technology*". In particolare, il Qubit è un fluorometro che, durante l'analisi, individua dei coloranti fluorescenti altamente specifici per una molecola (in questo caso il dsDNA). Queste sostanze emettono fluorescenza solo quando sono legate ai loro obiettivi e vengono assorbiti in pochi minuti potendo essere letti in pochi secondi dai fluorometri.

Questo strumento, che richiede solo 1 µL di campione per operare correttamente, restituisce un dato molto interessante che dà un'idea su quanto il nostro campione sia ricco di DNA e dunque di attività microbiologica, dato da prendere con le dovute accortezze (sito web: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

#### **4.3.4 Real time qPCR**

Abbiamo parlato a lungo nelle premesse dei vantaggi e del funzionamento della *Real Time qPCR*, ma è opportuno esporre anche i lati più tecnici di questa metodologia all'avanguardia nella seguente sezione dedicata.

Data l'alta concentrazione di DNA ottenuta dal Qubit è emersa l'esigenza di diluire il DNA in una soluzione in acqua 1:10.

Una volta diluiti i campioni si sono selezionati i primer connessi a geni le cui funzioni, in ambito di cicli dei nutrienti o meno, sono state esposte nelle premesse.

Di questi vengono però riportate le sequenze che vanno a individuare il tratto genico nella seguente tabella.

Tabella 4.2 Sequenze e letteratura dei Primer utilizzati (Maretto et al., 2023)

Primer	Sequenza	Letteratura
16S foward	GGGTTGCGCTCGTTGC	Zanardo et al., 2016
16S reverse	ATGGYTGTCGTCAGCTCGTG	
Bacterial <i>amoA</i> foward	GGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe et al., 1997
Bacterial <i>amoA</i> reverse	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
<i>nifH</i> foward	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	Rösch et al., 2002
<i>nifH</i> reverse	TTGTTSGCSGCRACATSGCCATCAT	
<i>nosZ</i> foward	CGYTGTTCMTGACAGCCAG	
<i>nosZ</i> reverse	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	
<i>nirK</i> foward	ATYGGCGGVCA YGGCGA	Henry et al., 2004
<i>nirK</i> reverse	RGCCTCGATCAGRITRTGGTT	
<i>gh48 8</i> foward	CGCCCCABGMSWWGTACCA	de Menezes et al., 2015
<i>gh48 5</i> reverse	GCYTCCCAIATRTCCATC	

Per i processi di *Real Time qPCR* è stato utilizzato un termociclatore QuantStudio 12K-Flex (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

La miscela di reazione è stata composta da 2,5 µL powerup SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), 0,15 µL ciascuno dei primer in *foward* e *reverse*, 1,2 µL di acqua autoclavata e 1 µL di DNA del campione (Maretto et al., 2023).

Per ogni corsa sono state effettuate tre repliche tecniche a campione e tre prove con acqua per verificare che non fossero i primer stessi a essere replicati e per controllare non ci fossero contaminazioni.

I campioni sono stati inseriti insieme alla mix nella quantità sopra descritta all'interno di una piastra 384 poi immessa nel termociclatore.

## 4.4 Analisi chimiche

I campioni sono stati inviati in laboratorio chimico per ottenere il contenuto di carbonio totale e di azoto totale, utili a determinare il rapporto C/N che influenza moltissimi processi biochimici.

### 4.4.1 Principio

A questo proposito il manuale Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo riporta il funzionamento dell'analisi elementare: "I diversi analizzatori elementari disponibili in commercio funzionano sulla base del metodo Dumas (1831). Il metodo analitico originale è fondato sulla completa istantanea ossidazione del campione per *flash combustion* con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche e di inorganiche in prodotti gassosi.

I gas di combustione vengono fatti passare prima in corrente di elio su opportuni catalizzatori, per completare il processo di ossidazione, e poi su strato di rame, per ridurre gli ossidi di azoto ad azoto molecolare. Successivamente la miscela gassosa viene separata per gascromatografia e CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> vengono rilevati da un detector a conducibilità termica. Per la determinazione del carbonio organico, il calcio carbonato eventualmente presente nel campione può essere rimosso prima dell'analisi per trattamento con KCl” (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo, 2000).

#### 4.4.2 Procedimento

Il procedimento prevede: la taratura dell'analizzatore elementare, il campionamento per la determinazione del carbonio organico e inorganico e dell'azoto, la determinazione delle quantità di carbonio e azoto. Per arrivare alla determinazione dei risultati, si rende necessaria la definizione del valore di taratura ottenuto analizzando quantità di una sostanza organica standard (acetanilide) di cui è noto il contenuto percentuale di carbonio azoto. Il valore del fattore K viene ottenuto utilizzando l'equazione:

$$K = \frac{\%t \cdot ms}{I}$$

*Dove:*

*%t=contenuto percentuale teorico di carbonio azoto nell'acetinilide*

*ms=massa dell'acetinilide utilizzata per la taratura dell'analizzatore espressa in milligrammi*

*I=area del picco relativo a ciascun composto gassoso*

Il contenuto di ciascun elemento viene invece espresso in g/kg e per il calcolo viene utilizzata l'espressione:

$$C = \frac{K \cdot I}{m} \cdot 10$$

*Dove:*

*C=contenuto di ciascun elemento, espresso in g/kg*

*K=valore medio del fattore di taratura*

*I=area del picco relativo a ciascun costituente gassoso (CO<sub>2</sub> N<sub>2</sub> per carbonio e azoto) derivato dal campione*

*m=massa del campione utilizzata, espressa in mg*

*10=fattore di proporzionalità*

#### 4.5 Analisi del pH

La variazione di pH nel suolo influenza notevolmente lo sviluppo della massa microbica: in suoli particolarmente acidi viene infatti favorita la comunità fungina rispetto a quella batterica, di conseguenza importanti processi legati al ciclo dell'azoto come azotofissazione e nitrificazione possono risultare rallentati. Il gradiente di pH ha grande influenza anche sulla solubilizzazione e capacità di assimilazione di nutrienti: l'eccesso di acidità, o viceversa di alcalinità, causa insolubilizzazione del fosforo ma anche di ferro e rame. Il grado di reazione del suolo, di cui il pH è funzione, condiziona notevolmente anche il suo stato di aggregazione: a valori bassi nella scala logaritmica, genera la distruzione degli aggregati, la compattazione del suolo, la riduzione della permeabilità dell'acqua e la contrazione del

volume per essiccamento (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo, 2000).

#### 4.5.1 Principio

Per la determinazione di questo importante parametro si è utilizzato un pH-metro, che sfrutta un principio potenziometrico, per calcolare la concentrazione di ioni  $H^+$  all'interno della soluzione. Lo strumento in questione possiede un vetro-elettrodo a calomelano e il sistema è esprimibile con un'equazione di questo tipo:

$$pH = \frac{(E - E') \cdot F}{2,303 \cdot RT}$$

*Dove:*

*E'*=termine comprendente il potenziale dell'elettrodo di riferimento, l'elettrodo interno, il potenziale di asimmetria dell'elettrodo di vetro e il potenziale di giunzione liquida

*R*=Costante generale dei gas perfetti

*T*=Temperatura assoluta in grado di kelvin

*F*=Costante di faraday uguale al numero di Avogadro moltiplicato per la carica unitaria cioè di un elettrone o di un protone

Il potenziale della cella *E* è proporzionale all'attività e quindi alla concentrazione di  $H^+$ . Tarando il pH su una o più soluzioni di riferimento l'equazione può essere risolta per determinare il valore nella mia soluzione di interesse.

$$pH = pH_{st} + \frac{E - E_{st}}{0,0591}$$

*Dove st sta per soluzione tampone usata per tarare lo strumento*

I pH-metri in commercio sono tarati per funzionare a 25°C temperatura alla quale per ogni unità di pH il potenziale varia di 0,0591 V.

#### 4.5.2 Procedimento

Dopo aver tarato lo strumento su due punti, tramite due soluzioni di pH noto (pH 4,1 e pH 6,86), si è proceduto con le misurazioni sia in soluzione acquosa sia in KCl 1 M. La maggior parte dei campioni sono infatti risultati avere un pH in acqua inferiore al 6,5 ed è opportuno in questi casi favorire la sostituzione degli idrogeni con il potassio del KCl per determinare la reale concentrazione in questi suoli particolarmente acidi. La determinazione del pH in KCl è inoltre più accurata e ha diversi vantaggi, tra cui il fatto che risulta meno influenzata dal rapporto suolo/soluzione, è indipendente dalla concentrazione di sali solubili, è coincidente per i campioni seccati all'aria e umidi e non varia anche dopo una prolungata conservazione del campione secco. Sono stati trasferiti 5 g di substrato minerale e 2,5 g di organico rispettivamente in 12,5 e 25 ml di soluzione utilizzando quindi rapporti suolo/soluzione di 1:2,5 e di 1:10.

Dopo aver agitato il campione si lascia sedimentare la sospensione per alcuni minuti e si introduce l'elettrodo nel surnatante, rilevando il valore di pH (Posizione Italiana: Metodo ufficiale n°III.1 Supplemento Ordinario G.U. n° 248 del 21/10/1999). Posizione Internazionale: ISO 10390) (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo, 2000).

## 5. Elaborazione dei dati e risultati

### 5.1 Conversione da Ct a copie geniche

In questa sezione viene analizzato il nostro dataset completo di dati chimici, relativi al contenuto in azoto totale, al carbonio organico e al pH, e di dati microbiologici, attinenti ai vari primer utilizzati e descritti nelle sezioni precedenti. I dati molecolari, prodotto della *Real Time qPCR*, risultavano espressi in Ct (*Cycle Threshold*), valore inversamente proporzionale all'abbondanza del tratto di DNA individuato dal primer e concettualmente fuorviante per questo motivo. È stata pertanto utilizzata la seguente equazione per convertire i Ct in copie geniche:

$$\text{Copie geniche} = 10^{\left(\frac{40-Ct}{3}\right)}$$

L'equazione per determinare il numero di copie geniche nel suolo per i geni mirati è stata calcolata partendo dai valori di Ct ottenuti sulla base di alcune curve di Calibrazione. Queste sono state costruite utilizzando concentrazioni specifiche di *Escherichia coli* per i geni funzionali bersaglio clonati in plasmidi di lunghezza nota (Maretto et al., 2023).

Sarebbe corretto applicare una formula specifica a ciascuno dei diversi geni individuati dai target utilizzati, ma questo potrebbe portare a dei *bias* dovuti soprattutto alla possibilità che più copie geniche si possano ripetere per più di una volta all'interno dello stesso genoma: come, ad esempio, l'*amoA* che è presente in tre copie identiche nel genoma del genere batterico *Nitrosospira* (Norton et al., 1996). Per questi motivi si è scelta una sola equazione e la si è applicata in modo univoco a tutti i nostri valori di Ct, non nell'ottica di determinare in maniera accurata le copie geniche, ma per risolvere la difficoltà concettuale nell'elaborare un dato inversamente proporzionale alla attività microbica, mantenendo però confrontabili e correlabili tra loro i valori.

### 5.2 Confronto delle medie tramite test post-hoc

Dopo aver controllato la presenza di eventuali outlier nel nostro dataset, si è proceduto con un iniziale confronto a due a due, tra le medie dei gruppi di dati individuati come simili. Questi sono rispettivamente le due tipologie di vegetazione (Tab. 5.2), i due orizzonti (Tab. 5.3) e i quattro diversi tipi di campioni (Tab. 5.1) ovvero abete minerale e organico e faggio minerale e organico. Sono stati effettuati una serie di test Post-hoc, in particolare test t di Student, a due code e con varianza dissimile o uguale in relazione al risultato di un previo test F tra i due gruppi di dati. Si è scelto come intervallo di confidenza il 95% e quindi il valore soglia di p per rifiutare o accettare l'ipotesi nulla è stato 0,05.

I risultati dei test t, per ogni categoria di dato sono riportati nelle seguenti tabelle. In queste sono stati indicati attraverso lettere uguali i gruppi aventi medie statisticamente identiche.

Tabella 5.1 Risultati dei test t per i quattro gruppi di campioni

	pH H2O	pH KCl	C/N	Concentrazione DNA [ $\mu\text{g/g}$ ]	<i>ITS2</i> *	<i>16S</i> *	<i>gh48</i> *	<i>amoA</i> *	<i>nirK</i> *	<i>nosZ</i> *	<i>nifH</i> *
Ab min	6,2 c	5,4 b	13,7 bc	77,5 b	1,33E+06 c	2,86E+08 a	7,22E+05 a	3,16E+04 a	7,45E+06 a	1,41E+05 b	1,58E+04 a
Ab O	5,1 b	4,5 c	18,5 a	104,1 a	2,24E+06 a	3,17E+08 a	4,02E+05 b	7,88E+04 a	3,34E+06 bc	1,86E+04 a	9,40E+03 b
Fag min	6,7 a	6,0 a	13,4 b	91,9 ab	5,20E+05 b	2,20E+08 c	2,65E+05 c	3,66E+04 a	4,51E+06 b	2,35E+05 b	2,55E+04 c
Fag O	5,5 b	4,8 bc	18,7 a	103,7 a	2,55E+06 a	2,75E+08 a	3,19E+05 bc	4,23E+04 a	3,23E+06 c	2,65E+04 a	3,86E+04 d

Nella tabella sono riportate le medie dei gruppi di campioni, contrassegnati da lettere a indicare i rapporti tra le medie dei valori. In particolare, lettere uguali indicano gruppi di dati con medie non significativamente diverse considerando un intervallo di confidenza del 95% ( $p < 0,05$ ). \*I valori relativi ai primer sono espressi in copie geniche.

Tabella 5.2 Risultati dei test t per i due tipi di copertura vegetale

	pH H2O	pH KCl	C/N	Concentrazione DNA [ $\mu\text{g/g}$ ]	<i>ITS2</i> *	<i>16S</i> *
Picea abies	5,6 a	4,9 a	16,1 a	90,8 a	1,78E+06 a	3,01E+08 a
Fagus sylvatica	6,1 a	5,4 a	16,0 a	97,8 a	1,53E+06 a	2,47E+08 b
	<i>gh48</i> *	<i>amoA</i> *	<i>nirK</i> *	<i>nosZ</i> *	<i>nifH</i> *	
Picea abies	5,62E+05 a	5,52E+04 a	5,39E+06 a	7,97E+04 a	1,26E+04 a	
Fagus sylvatica	2,92E+05 b	3,94E+04 a	3,87E+06 a	1,31E+05 a	3,20E+04 b	

Nella tabella sono riportate le medie dei campioni dei due siti (faggio e abete rosso), contrassegnati da lettere a indicare i rapporti tra le medie dei valori. In particolare, lettere uguali indicano gruppi di dati con medie non significativamente diverse considerando un intervallo di confidenza del 95% ( $p < 0,05$ ). \*I valori relativi ai primer sono espressi in copie geniche.

Tabella 5.3 Risultati dei test t per i due tipi di orizzonti

	pH H2O	pH KCl	C/N	Concentrazione DNA [ $\mu\text{g/g}$ ]	<i>ITS2</i> *	<i>16S</i> *
Orizzonte minerale	6,4 a	5,7 a	13,5 a	84,7 a	9,23E+05 a	2,53E+08 a
Orizzonte organico	5,3 b	4,6 b	18,6 b	103,9 b	2,39E+06 b	2,96E+08 b
	<i>gh48</i> *	<i>amoA</i> *	<i>nirK</i> *	<i>nosZ</i> *	<i>nifH</i> *	
Orizzonte minerale	4,93E+05 a	3,41E+04 a	5,98E+06 a	1,88E+05 a	2,06E+04 a	
Orizzonte organico	3,61E+05 b	6,05E+04 a	3,28E+06 b	2,25E+04 b	2,40E+04 a	

Nella tabella sono riportate le medie dei campioni appartenenti ai due diversi orizzonti (minerale e organico), contrassegnati da lettere a indicare i rapporti tra le medie dei valori. In particolare, lettere uguali indicano gruppi di dati con medie non significativamente diverse considerando un intervallo di confidenza del 95% ( $p < 0,05$ ). \*I valori relativi ai primer sono espressi in copie geniche.

### 5.3 Studio delle correlazioni tra i vari parametri

Successivamente sono state svolte correlazioni tra tutti i dati disponibili attraverso un test di Pearson che restituisce un valore di r (coefficiente di correlazione lineare) indice dell'entità e della forza della relazione lineare presente tra due parametri. Prima di tutto si è effettuata la media aritmetica tra i quattro diversi gruppi di dati distinti per vegetazione e orizzonte considerato, nell'ottica di ottenere un dataset che fosse rappresentativo della media dei campioni in ogni sito e che trascendesse dalla loro variabilità. Successivamente si è svolta la vera e propria correlazione di Pearson che ha permesso di ottenere i valori di r interpretabili in questo modo: per valori positivi sussiste una relazione lineare positiva cioè di proporzionalità diretta, a valori negativi invece una relazione lineare negativa, cioè una proporzionalità inversa.

I risultati, espressi in una matrice tematizzata con una scala di colore per facilitare la fruizione del dato, sono presentati di seguito (Tab. 5.4).

Tabella 5.4 Risultati della correlazione

	DNA_conc	pH_H2O	pH_KCl	C/N	ITS2	16S	gh48	amoA	nirK	nosZ	nifH
DNA_conc	1	0,927354	0,883041	-0,86759	-0,74725	-0,73491	0,264784	-0,95607	0,69626	0,828745	0,300358
pH_H2O	0,9273537	1	0,994309	-0,92603	-0,92378	-0,87069	0,033336	-0,80139	0,542661	0,973291	0,184735
pH_KCl	0,8830408	0,994309	1	-0,91017	-0,9437	-0,89571	-0,04889	-0,74146	0,471448	0,985805	0,167576
C/N	-0,8675917	-0,92603	-0,91017	1	0,941671	0,631431	-0,33941	0,686033	-0,76441	-0,94084	0,167466
ITS2	-0,7472485	-0,92378	-0,9437	0,941671	1	0,749273	-0,0408	0,528312	-0,51431	-0,98582	0,157683
16S	-0,7349076	-0,87069	-0,89571	0,631431	0,749273	1	0,444662	0,670886	-0,07286	-0,83265	-0,51001
gh48	0,264784	0,033336	-0,04889	-0,33941	-0,0408	0,444662	1	-0,23842	0,857489	0,000612	-0,49604
amoA	-0,9560725	-0,80139	-0,74146	0,686033	0,528312	0,670886	-0,23842	1	-0,60607	-0,64606	-0,51407
nirK	0,6962604	0,542661	0,471448	-0,76441	-0,51431	-0,07286	0,857489	-0,60607	1	0,504147	-0,33191
nosZ	0,828745	0,973291	0,985805	-0,94084	-0,98582	-0,83265	0,000612	-0,64606	0,504147	1	0,003776
nifH	0,3003579	0,184735	0,167576	0,167467	0,157683	-0,51001	-0,49604	-0,51407	-0,33191	0,003776	1

*Nella tabella vengono espressi i risultati di valore della correlazione di Pearson in una matrice che riassume tutte le combinazioni tra le tipologie di dati presenti. I valori di r ottenuti dal test sono stati tematizzati per favorire la fruizione della tabella.*

### 5.4 Analisi delle Componenti Principali (PCA)

Come ultima elaborazione è stato utilizzato il software R studio per effettuare un'analisi delle componenti principali. Questo tipo di analisi, visualizzato nei risultati tramite un biplot, ci permette di esaminare contemporaneamente un grande numero di dati, conservando il maggior numero di informazioni possibili. Nel biplot vengono utilizzate due componenti principali come variabili ricondotte ai due assi cartesiani ciascuna delle quali è influenzata in modo più o meno forte dalle variabili di partenza.

Queste contribuiscono in una certa misura a clusterizzare (raggruppare) i dati secondo caratteristiche simili. Nei biplot, infatti, oltre ai dati clusterizzati in modo diverso a seconda delle categorie considerate, compaiono anche dei vettori, la cui lunghezza e direzione indicano come ciascuna variabile influenza il raggruppamento dei dati. Ad esempio, due variabili con vettori che si sviluppano circa nella stessa direzione contribuiranno a raggruppare i dati nella stessa modalità (con equazioni simili) rispetto alle due componenti principali (Dim 1 e Dim 2).

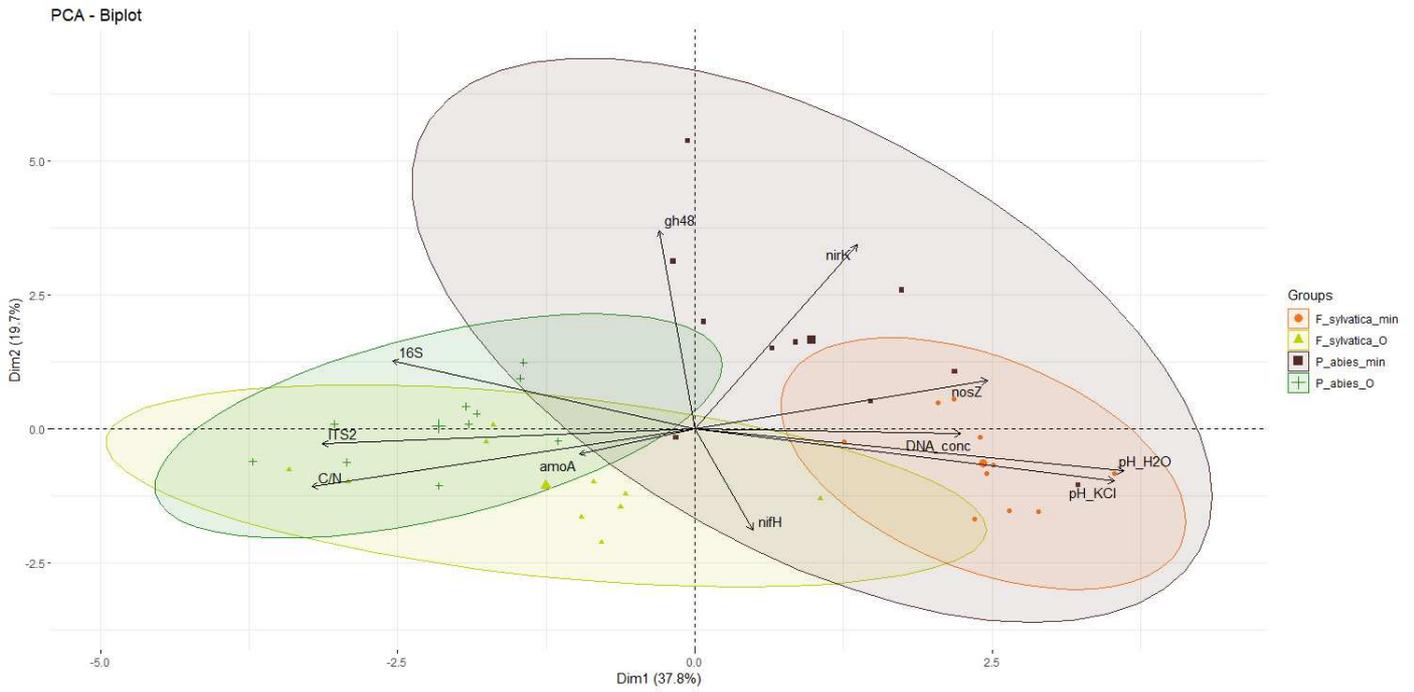


Figura 5.1 Biplot rappresentante i dati disposti nel piano cartesiano risultanti da una PCA (analisi delle componenti principali). In questo biplot si possono apprezzare i dati relativi alle quattro tipologie campionate, i quattro cluster risultano in parte sovrapposti.

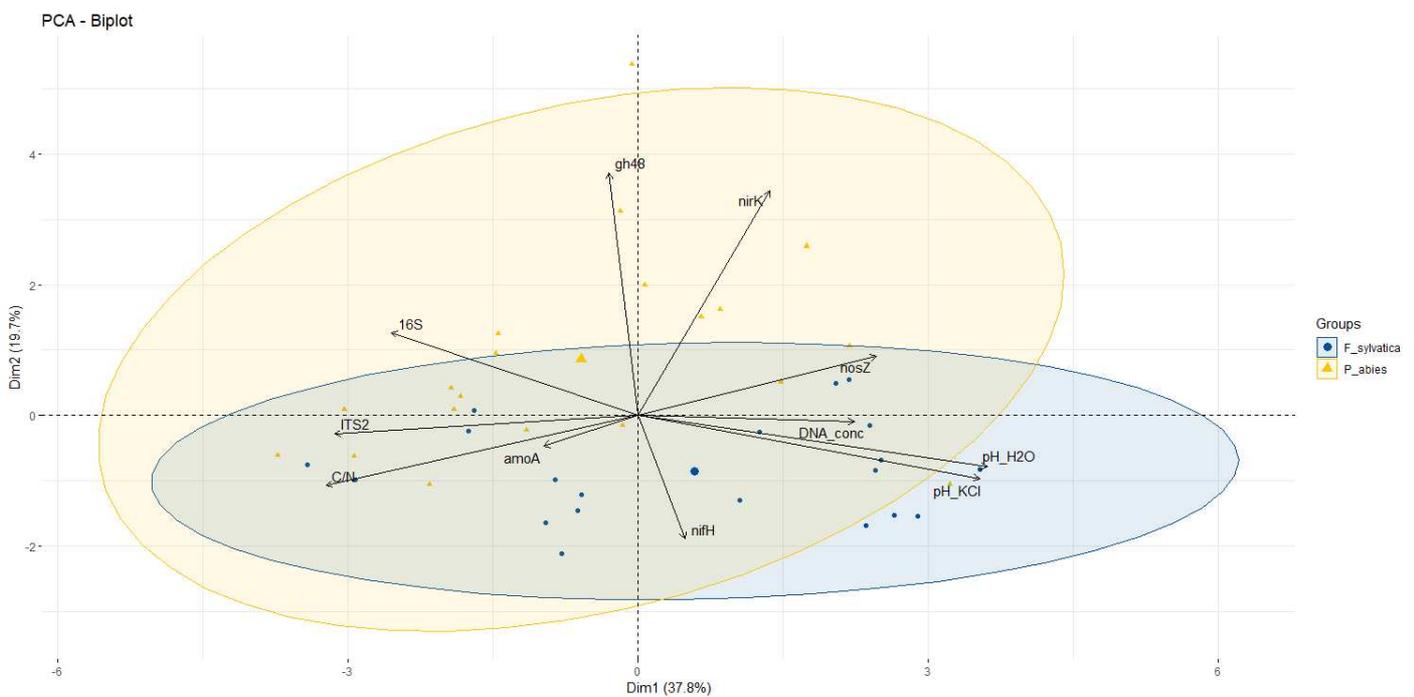


Figura 5.2 Biplot rappresentante i dati disposti nel piano cartesiano risultanti da una PCA (analisi delle componenti principali). In questo biplot si possono apprezzare i dati relativi alle due tipologie di vegetazione. Questi dati si raggruppano solo parzialmente e i due cluster risultano in parte sovrapposti.

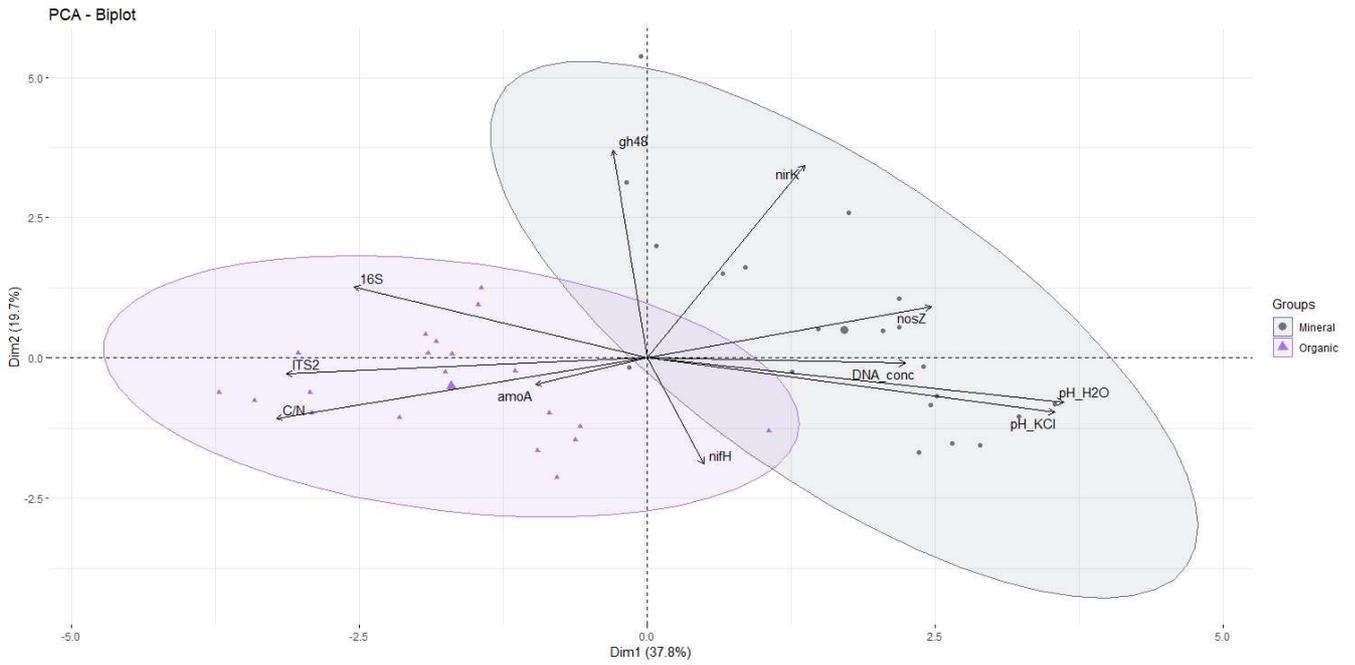


Figura 5.1 Biplot rappresentante i dati disposti nel piano cartesiano risultanti da una PCA (analisi delle componenti principali). In questo biplot si possono apprezzare i dati relativi alle due tipologie di orizzonti campionati. Questi dati si raggruppano in maniera chiara e i due cluster esplicitano graficamente le differenze significative ottenute dai test t.

## 6. Discussione

I test t hanno permesso di studiare significative differenze sia tra i dati dei quattro principali tipi di campione ovvero abete rosso e faggio minerali e organici, ma anche di valutare se effettivamente, come ipotizzato all'inizio di questo lavoro, ci fossero differenze significative tra i suoli coperti da vegetazione differente e tra orizzonti diversi. Oltre ad una valutazione dei valori di significatività dei  $p^*$  ottenuti, vengono anche commentati i dati in relazione alla loro visualizzazione grafica tramite dei grafici boxplot.

Per quanto riguarda i dati chimici di pH e di rapporto C/N si registrano differenze significative tra orizzonti organici e minerali, senza tuttavia evidenziare uno scarto statisticamente rilevante tra le medie relative al faggio e quelle relative all'abete rosso che rimangono simili per entrambi i parametri, seppure la media di pH del faggio risulti maggiore.

Negli orizzonti organici, come ci si aspetta, il valore di pH è marcatamente inferiore (Fig. 6.1) e il rapporto C/N risulta maggiore a causa dell'accumulo di materiale organico che fa aumentare la quantità di carbonio in questo orizzonte (Fig. 6.2). In queste condizioni acide sono sfavoriti infatti i processi di mineralizzazione e favoriti invece quelli di accumulo della lettiera (Janssen,1996; Boberg et al., 2010).



Figura 6.1 Boxplot che rappresentano la distribuzione dei dati del pH ottenuto sia in soluzione acquosa sia in KCl 1 M per i quattro tipi di campione.

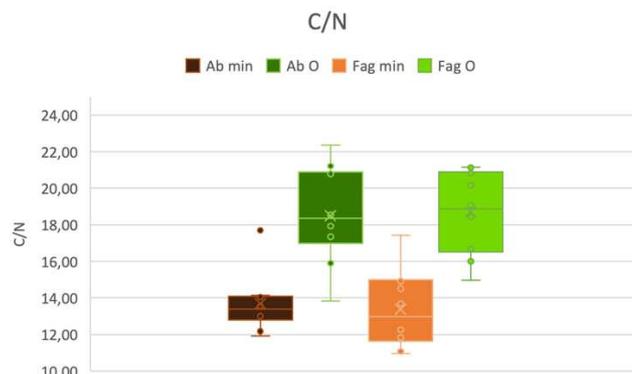


Figura 6.2 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del rapporto C/N per i quattro tipi di campione.

Per quanto riguarda il dato generale di concentrazione di DNA ottenuto tramite il fluorometro, emerge anche in questo caso una grande differenza tra orizzonti organici, in cui il valore medio è maggiore, e minerali, più poveri di DNA (Fig. 6.3) (Varma e Choudhary, 2019). Ancora una volta tra vegetazioni differenti, nonostante la media dei campioni prelevati nel sito di faggio sia più abbondante rispetto a quella dell'abete rosso, lo scarto tra queste non è sufficiente per rifiutare l'ipotesi nulla del test t.

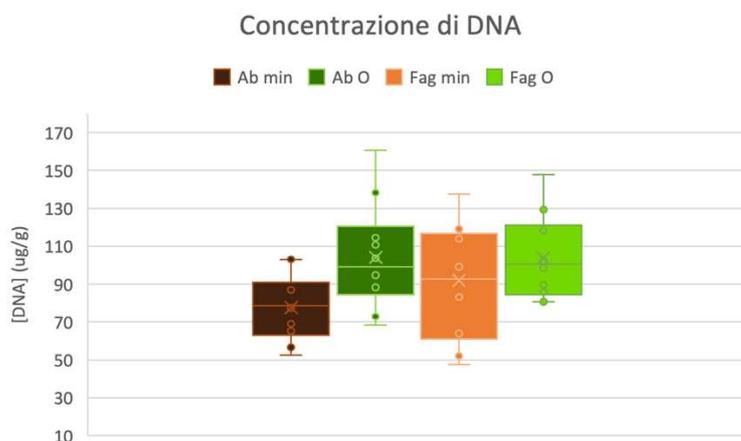


Figura 6.3 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati della concentrazione di DNA per i quattro tipi di campione.

Passando in rassegna l'insieme di primer utilizzati nella *Real Time qPCR* si può sostenere, come detto già in precedenza, che per la maggior parte dei geni ci sia una differenza marcata tra orizzonti minerali e organici con una tendenza ad una maggiore attività negli orizzonti organici (Fig. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 6.10).

Le eccezioni a quanto detto sono rappresentate dai geni *amoA* e *nifH* che non sono invece significativamente differenti in questi due orizzonti, mentre le copie geniche di *nifH* differiscono significativamente per la diversa copertura vegetale.

I risultati relativi al *16S*, al *gh48* e al *nifH* sono in controtendenza rispetto a tutti gli altri dati. Per queste categorie come già in parte evidenziato c'è una sostanziale differenza tra i dati relativi alla faggeta e alla pecceta. Si può dire quindi ipotizzare che ci siano altri fattori, diversi da quelli indagati nel lavoro, responsabili di una maggiore attività batterica nel suolo sia per il *16S* e per il *gh48* nell'abete rosso, sia per il *nifH* nel faggio. Queste sono le uniche differenze significative evidenziate in queste due situazioni parallele e sono interpretabili come una maggiore incidenza dei processi di attività cellulosolitica dei batteri nei suoli dell'abete, coerente con l'idea che le lettiera di conifere siano più ricche di queste sostanze e di altre anche più recalcitranti.

A queste deduzioni si può aggiungere una maggiore attività microbica legata all'azotofissazione nel suolo della faggeta in cui, allo stesso tempo, si manifesta una minore rilevanza del processo di ammonificazione, guidato dall'enzima ammoniacica monossigenasi e individuato dal gene *amoA*.

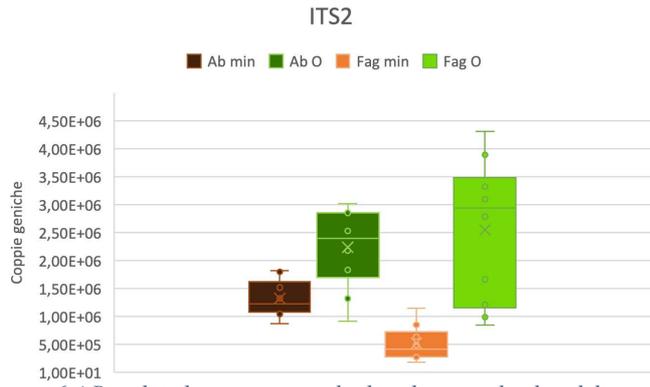


Figura 6.4 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche dell'ITS2 per i quattro tipi di campione.



Figura 6.5 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche del 16S per i quattro tipi di campione.

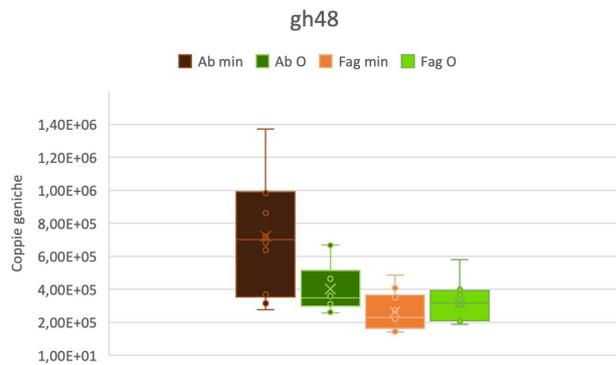


Figura 6.6 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche del gh48 per i quattro tipi di campione.

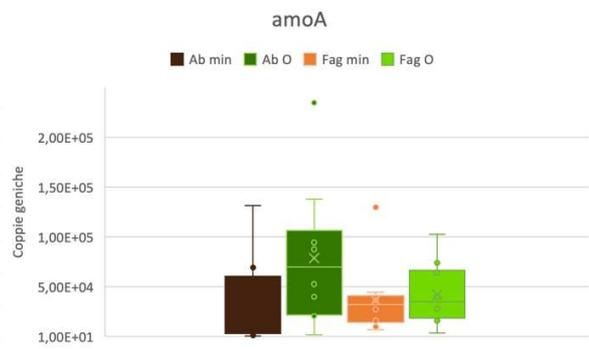


Figura 6.7 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche dell'amoA per i quattro tipi di campione.

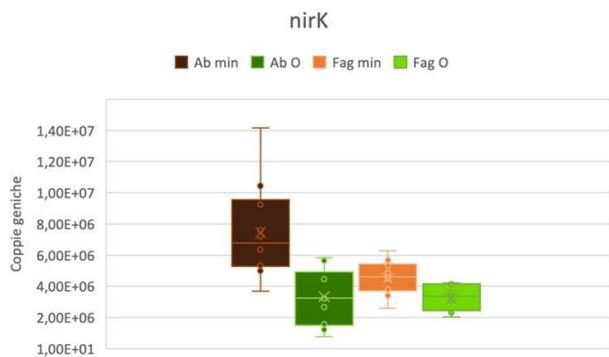


Figura 6.8 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche del nirK per i quattro tipi di campione.

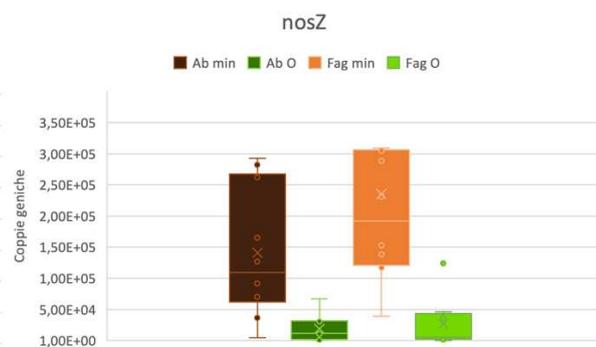


Figura 6.9 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche del nosZ per i quattro tipi di campione.

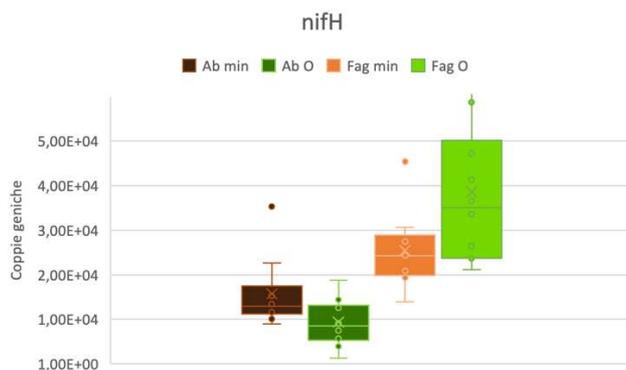


Figura 6.10 Boxplot che rappresenta la distribuzione dei dati del numero di copie geniche del nifH per i quattro tipi di campione.

Queste importanti differenze volgono verso una precisa direzione che porta a distinguere in maniera chiara i due gruppi di dati relativi al diverso orizzonte considerato (Fig. 5.3) ma anche, seppur più timidamente, ad una distinzione tra i quattro gruppi di dati campionati originariamente (Fig. 5.1).

Questa clusterizzazione, apprezzabile già dalle tabelle relative ai test t, è palesata e rappresentata in modo efficace nella PCA. Da questa non solo si riescono a validare alcune delle ipotesi ricavate dai test post-hoc, ma anche a comprendere, grazie ai vettori rappresentati nei biplot, l'influenza delle variabili in questo processo di raggruppamento.

È interessante notare come le variabili del pH e del C/N non siano le uniche a contribuire alla dinamica di unione, ma che questa sia alimentata anche dai dati microbiologici delle copie geniche o della concentrazione di DNA. Questo sancisce quindi quanto la comunità microbica abbia un ruolo chiave nella caratterizzazione dei gruppi ottenuti e ne rimarca quindi la sua fondamentale funzione e variabilità. Dall'analisi delle componenti principali, si apprezza anche una difficoltà nel dimostrare la marcata differenza tra i due siti in relazione alla vegetazione, infatti i due cluster risultano molto sovrapposti e quindi simili tra loro (Fig. 5.2).

Per poter indagare in modo approfondito come queste variabili siano in relazione tra loro è essenziale fare riferimento ai risultati ottenuti dalle correlazioni di Pearson. Per le correlazioni è stato utilizzato il valore di pH in KCl perché risulta essere più accurato come precedentemente riportato nella sezione di materiali e metodi.

Prima di tutto da questi valori si può constatare che il valore del pH è fortemente e negativamente correlato al rapporto C/N (vedi tab). Questa tendenza è tipica nel fenomeno di acidificazione dei suoli relazionata all'accumulo di lettiera e all'aumento conseguente di carbonio organico e del rapporto in questione (Boberg et al., 2010).

Superando gli aspetti prettamente chimici, l'abbondanza di DNA espressa come concentrazione nel suolo è negativamente correlata al pH. Questo ci suggerisce come all'aumentare dell'acidità aumenti l'attività microbica. Per certi aspetti questa affermazione può risultare contraddittoria ma è sempre opportuno ricordarsi che non si sta parlando di valori di pH estremi (con una media di 4,9 per l'abete rosso e 5,4 per il faggio). Se si analizza ulteriormente questo aspetto, considerando la relazione che vige tra il pH e l'attività fungina e batterica distinte, si possono confermare e discutere alcuni aspetti affrontati nelle premesse. È stato affermato in precedenza che in suoli acidi gli organismi fungini risultano più performanti rispetto ai batteri grazie al loro più ampio optimum. In effetti sussiste una relazione lineare negativa tra pH e geni fungini che però non è accompagnata da una correlazione positiva con il gene *16S*, seppure il valore di r riporti una più debole correlazione.

Si può però affermare che il pH non sia uno dei fattori che favorisce l'uno o l'altro regno, specialmente in condizioni di abbondanza di nutrienti, come nel caso di scarsi C/N in cui i batteri possono perfino superare l'attività fungina (Staňková et al., 2015).

Da questo punto di vista potrebbe essere interessante studiare anche l'influenza del rapporto C/N sull'attività di batteri e funghi. Questo tipo di indagine è presente in letteratura in svariate pubblicazioni, in cui si indaga in particolare sul rapporto "funghi/batteri".

Strickland e Rousk nel 2010 riportano infatti uno studio che racchiude una serie di casistiche in cui il rapporto in questione risultava anomalo rispetto a quanto ipotizzato.

Nel medesimo lavoro viene efficacemente esposto come a partire dal rapporto C/N della biomassa media di funghi e batteri, rispettivamente di 5-15 e 3-6, ci si aspetta una maggiore adattabilità dei funghi rispetto ai batteri. In breve a parità di C, per quantità limitanti di azoto ci si attende una dominanza del regno fungino rispetto al batterico, fornendo utili modelli di previsione sia in ambito agrario per la fertilizzazione, sia in ambito forestale per la qualità della lettiera. Tuttavia, a causa della

difficoltà nel far emergere la casualità generata da molti altri fattori, come il pH e la diversa copertura vegetale, i risultati sono spesso differenti da quanto ci si aspetta. Si può dire che anche nel nostro studio ci sia una manifestazione di quanto evidenziato in precedenza. Sussiste in effetti una correlazione positiva tra C/N e copie geniche dell'*ITS2* ma questa è accompagnata da un'altra relazione positiva tra il rapporto C/N e l'abbondanza di DNA batterico espressa dal gene *16S*. La relazione tra l'abbondanza di *16S* e C/N, seppure correlata in modo minore rispetto a quella dell'*ITS2*, costituisce una contraddizione con quanto ci si può aspettare. Questo dato è oltretutto sostenuto da una abbondanza maggiore del gene *16S* nei campioni in cui il rapporto medio C/N è maggiore. L'asimmetria, tra aspettativa e dato, rilevata in ambito di rapporto "funghi/batteri" è confermata anche dalla relazione positiva ottenuta tra *ITS2* e *16S*. Anche in questo caso si potrebbe pensare ad una relazione di competizione, e quindi inversa, tra i due tipi di microrganismi, sfatata dal valore di *r*, la cui abbondanza è stimata dallo studio della quantificazione di *16S* e *ITS2*. Questo esito può essere decifrato come una assenza di condizioni restrittive (né di pH, né di disponibilità di azoto) che mettano in rivalità attività fungina e batterica.

Tornando al pH questo non risulta correlato col *gh48* che è invece positivamente legato al rapporto C/N. Quest'ultimo risultato è coerente con l'idea che dove c'è una maggiore quantità di carbonio accumulato ci sia una maggiore attività batterica cellulolitica.

I processi di nitrificazione e denitrificazione appaiono strettamente connessi alla disponibilità di azoto e quindi al C/N. L'attività del primo, in particolare, che studiamo attraverso l'*amoA*, diminuisce all'aumentare della disponibilità di azoto. Ciò che otteniamo sembra essere in contraddizione con quanto anticipato nelle premesse relative al ciclo dell'azoto e nella seconda fase della figura 2.8. In queste veniva espresso che, quando l'azoto risulta in eccesso rispetto al fabbisogno di piante e microrganismi, si innesca il processo di nitrificazione dell'ammonio (Staňková et al., 2015). Tutto però dipende dai valori di C/N che in questo caso risultano dentro i range di optimum sia batterici che fungini.

La denitrificazione invece è correlata direttamente al pH e inversamente al C/N. Ciò manifesta quindi una spiccata attività denitrificante all'aumentare della quantità dell'azoto.

Dal momento che all'aumentare della disponibilità dell'azoto crescono i processi di denitrificazione e decrescono quelli di nitrificazione, si può quindi ipotizzare, con le dovute accortezze, che le condizioni del suolo nel momento del campionamento fossero particolarmente asfittiche e che favorissero questo tipo di processi anaerobi.

Il processo di azotofissazione studiato attraverso il gene *nifH* non risulta relazionata né al C/N né al pH. Può essere interessante studiare separatamente l'azotofissazione cioè per le due diverse coperture vegetali, in particolare inserendone i dati in un grafico a dispersione, in relazione ai due parametri sopra citati. La tendenza della relazione lineare rappresentata è opposta nelle due circostanze vegetazionali (Fig. 6.11, 6.12). Ciò manifesterebbe un'attitudine discorde dell'attività di azotofissazione nelle due casistiche legate alla componente vegetale: con una risposta positiva all'aumento del pH e alla disponibilità di azoto nel caso dell'abete rosso, parallela ad una propensione opposta nel caso del faggio.

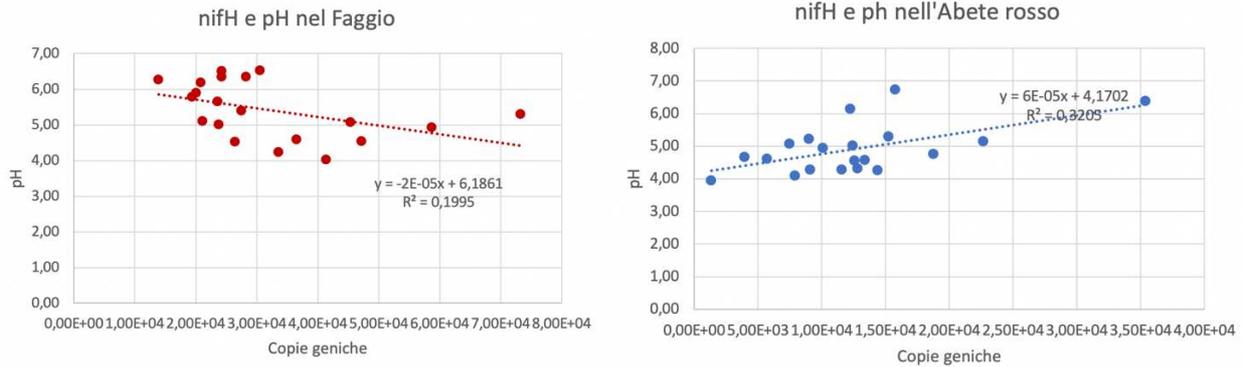


Figura 6.11 Diagrammi a dispersione che mostrano grazie alla linea di tendenza l'andamento opposto della quantità di copie geniche del nifH in relazione al pH nel faggio e nell'abete rosso.

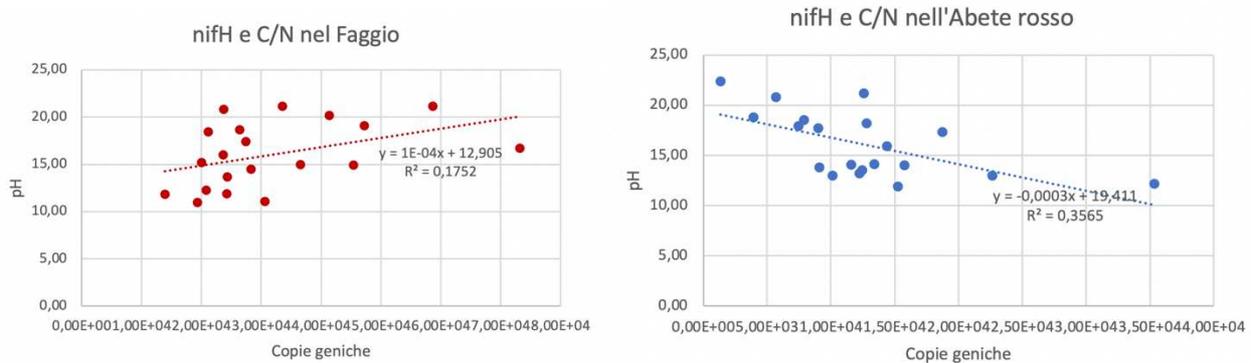


Figura 6.12 Diagrammi a dispersione che mostrano, grazie alla linea di tendenza, l'andamento opposto della quantità di copie geniche del nifH in relazione al C/N nel faggio e nell'abete rosso.

Viene evidenziata una relazione positiva tra le paia di basi del gene *nirK* e quelle relative al *nosZ*, il cui legame è stato studiato nell'ottica di comprendere se vi fosse continuità all'interno della fase di denitrificazione in cui i due geni codificano per enzimi che si occupano di una delle prime fasi e dell'ultima. Il dato di *r* ottenuto è 0,50, un valore non molto elevato che per definizione spiega questa correlazione per il 50% del nostro dataset. Come è ben visibile dalla figura 2.11, che viene riportata nuovamente per praticità, dopo l'azione della nitrato-reduttasi la denitrificazione si divide in due vie parallele, guidate rispettivamente da funghi e batteri, per poi ricongiungersi grazie all'azione della ossidinitroso-reduttasi. Dal momento che si sta indagando la relazione tra quest'ultimo e l'attività esclusiva della nitrito reduttasi batterica, questo risultato, seppur preso con le pinze, può essere esplicativo della struttura di questo processo.

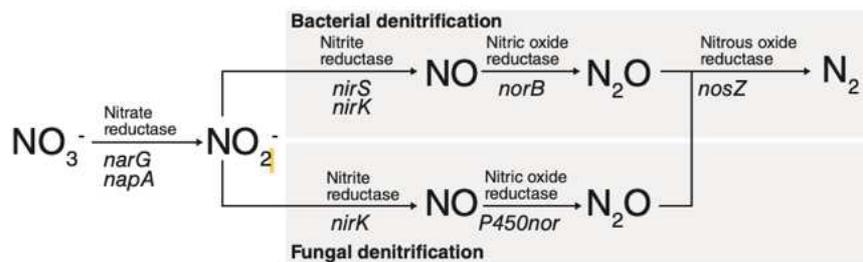


Figura 2.11 Via metabolica di denitrificazione in cui sono indicati gli enzimi chiave e i geni utili alla loro identificazione tramite i primer.

## 7. Conclusioni

Valutando in maniera riassuntiva i risultati ottenuti si possono trarre alcune conclusioni e alcune valutazioni per eventuali approfondimenti futuri.

Innanzitutto, si può affermare che il campionamento nel sito, distintivo di orizzonte organico e minerale, è stato fatto correttamente e gli esiti delle analisi effettuate in laboratorio restituiscono marcate differenze tra questi campioni. Questi aspetti distintivi degli orizzonti ne caratterizzano gli aspetti chimici, soprattutto manifestati da un maggiore pH, ma anche biologici, riassumibili con una maggiore concentrazione di DNA nel substrato organico.

Uno degli obiettivi del lavoro era quello di dimostrare una differenza a livello chimico e microbiologico di suoli con diversa vegetazione forestale. Nonostante non si possa dire che questa tesi sia stata dimostrata a pieno, si sono evidenziate in ogni caso alcune interessanti differenze come una maggiore abbondanza di DNA batterico attestata dal gene *16S*, nel popolamento di abete rosso, declinata in particolare in una maggiore attività cellulolitica stimata dall'abbondanza del *gh48*. Grazie al gene *nifH* strettamente connesso all'azotofissazione, si suppone una maggiore attività nei suoli della faggeta, in controtendenza con i risultati relativi agli altri geni. Grazie alle correlazioni è stata riscontrata una asimmetria nella relazione tra azotofissazione, pH e C/N, di natura opposta a seconda della copertura vegetale.

Si può inoltre affermare che seppure non si siano dimostrate ampie differenze nelle caratteristiche microbiologiche e chimiche dei due siti, si sono potuti comprovare con successo, ritrovando spesso riscontro nella letteratura, stretti legami tra proprietà chimiche del suolo e attività microbiologica.

Nell'ottica di studiare in modo più approfondito l'interazione tra il cosiddetto plant-factor e l'attività microbiologica del suolo potrebbe essere estremamente interessante non fermarsi alla quantificazione dei geni funzionali di interesse tramite la *Real Time qPCR*, ma analizzarne anche la composizione.

Più che mai lo studio tramite le tecniche di sequenziamento genetico dei generi fungini e batterici che colonizzano il suolo, permetterebbe di comprendere il legame tra questi e fattori più o meno esterni: come la vegetazione, nel nostro caso, o l'uomo in esempi più antropizzati e agrari.

## Bibliografia

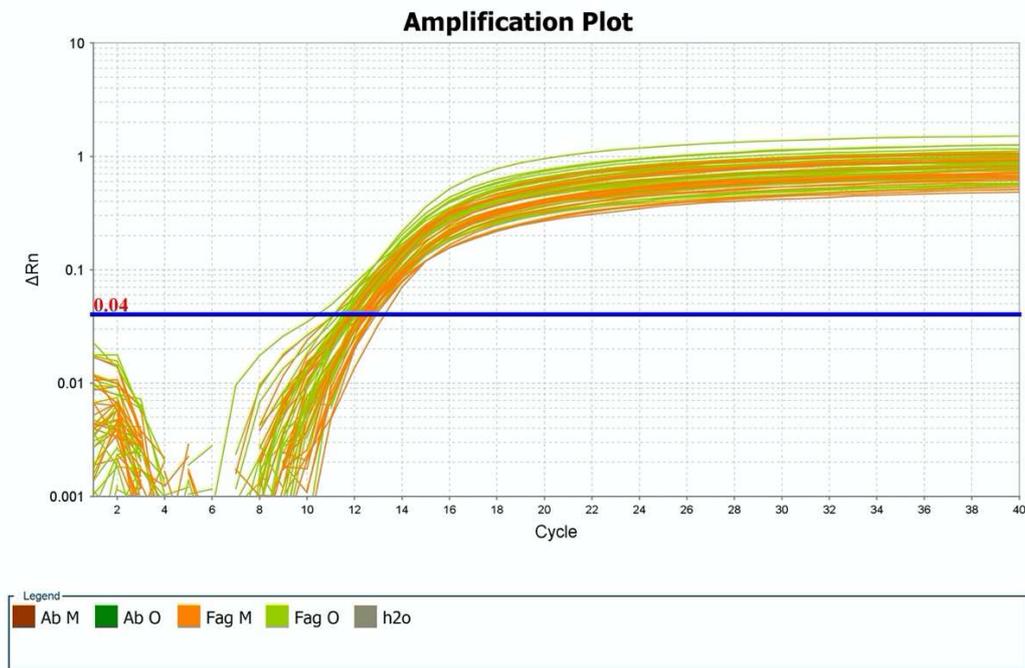
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental microbiology*, 6(8), 769-779.
- Barbi, A., Cagnati, A., Cola, G., Checchetto, F., Chiaudani, A., Crepaz, A., ... & Robert-Luciani, T. (2013). Atlante climatico del Veneto. *Precipitazioni-Basi informative per l'analisi delle correlazioni tra cambiamenti climatici e dinamiche forestali nel Veneto. Regione del Veneto, Mestre, Italy.*
- Boberg, J. B., Finlay, R. D., Stenlid, J., & Lindahl, B. D. (2010). Fungal C translocation restricts N-mineralization in heterogeneous environments. *Functional Ecology*, 24(2), 454-459.
- de Menezes, A. B., Prendergast-Miller, M. T., Poonpatana, P., Farrell, M., Bissett, A., Macdonald, L. M., ... & Thrall, P. H. (2015). C/N ratio drives soil actinobacterial cellobiohydrolase gene diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3016-3028.
- Dibona, D. 1984. Ciclo evolutivo della sostanza organica e capacità produttive di alcuni terreni forestali in relazione alla variazione della copertura vegetale. Relatori Dell'Agnola G. e Nardi S. Istituto di Chimica Agraria, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- Dickie, I. A., Martínez-García, L. B., Koele, N., Grelet, G. A., Tylianakis, J. M., Peltzer, D. A., & Richardson, S. J. (2013). Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant and Soil*, 367, 11-39.
- Duan, Y., Chen, L., Zhang, J., Li, D., Han, X., Zhu, B., ... & Huang, P. (2021). Long-term fertilisation reveals close associations between soil organic carbon composition and microbial traits at aggregate scales. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 306, 107169.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 4117-4120.
- Garlato, A., Obber, S., Vinci, I., Ragazzi, F., Pocaterra, F. e Zamarchi, P. (2019). Carta dei suoli del veneto 1:250.000. ARPAV Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto.
- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., & Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058-2067.
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., & Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods*, 59(3), 327-335.
- Hermansson, A., & Lindgren, P. E. (2001). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 972-976.
- Janssen, B. H. (1996). Nitrogen mineralization in relation to C: N ratio and decomposability of organic materials. In *Progress in Nitrogen Cycling Studies: Proceedings of the 8th Nitrogen Workshop held at the University of Ghent, 5–8 September, 1994* (pp. 69-75). Springer Netherlands.
- Jenny, H. (1958). Role of the plant factor in the pedogenic functions. *Ecology*, 39(1), 5-16.
- Jetten, M. S. (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environmental microbiology*, 10(11), 2903-2909.
- Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., & Itoh, K. (2003). Quantitative measurement of fungal DNA extracted by three different methods using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 337-343.

- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of biotechnology*, 75(2-3), 187-194.
- Laverman, A. M., Speksnijder, A. G. C. L., Braster, M., Kowalchuk, G. A., Verhoef, H. A., & Van Verseveld, H. W. (2001). Spatiotemporal stability of an ammonia-oxidizing community in a nitrogen-saturated forest soil. *Microbial Ecology*, 42, 35-45.
- Ma, Y., Zilles, J. L., & Kent, A. D. (2019). An evaluation of primers for detecting denitrifiers via their functional genes. *Environmental microbiology*, 21(4), 1196-1210.
- Maretto, L., Deb, S., Ravi, S., Della Lucia, M. C., Borella, M., Campagna, G., ... & Stevanato, P. (2023). 16S metabarcoding, total soil DNA content, and functional bacterial genes quantification to characterize soils under long-term organic and conventional farming systems. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 1-15.
- Mendum, T. A., Sockett, R. E., & Hirsch, P. R. (1999). Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the  $\beta$  subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4155-4162.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Prodromo della Vegetazione d'Italia. <https://www.prodromo-vegetazione-italia.org/>
- Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo, 2000. *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo (Ed. P. Violante in collaboration with International Union of Soil Science and Società Italiana della Scienza del Suolo)*. Franco Angeli Milano.
- Norton, J. M., Low, J. M., & Klotz, M. G. (1996). The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS microbiology letters*, 139(2-3), 181-188
- Paterson, E., Osler, G., Dawson, L. A., Gebbing, T., Sim, A., & Ord, B. (2008). Labile and recalcitrant plant fractions are utilised by distinct microbial communities in soil: independent of the presence of roots and mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1103-1113.
- Qiagen: DNeasy PowerSoil Pro Kits. (n.d.). <https://www.qiagen.com/us>
- Regione Veneto: Arpav. Il Geoportale della regione del Veneto. <https://idt2.regione.veneto.it/idt/search/searchPage> .
- Rösch, C., Mergel, A., & Bothe, H. (2002). Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3818-3829
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4704-4712
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, 4(10), 1340-1351
- Šantrůčková, H., Křišťůfková, M., & Vaněk, D. (2006). Decomposition rate and nutrient release from plant litter of Norway spruce forest in the Bohemian Forest. *Biologia*, 61(20), S499-S508.
- Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 85(3), 591-602.
- Schmidt, S. K., Lipson, D. A., Ley, R. E., Fisk, M. C., & West, A. E. (2004). Impacts of chronic nitrogen additions vary seasonally and by microbial functional group in tundra soils. *Biogeochemistry*, 69(1), 1-17.
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., & Dean, D. R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual review of biochemistry*, 78, 701-722.

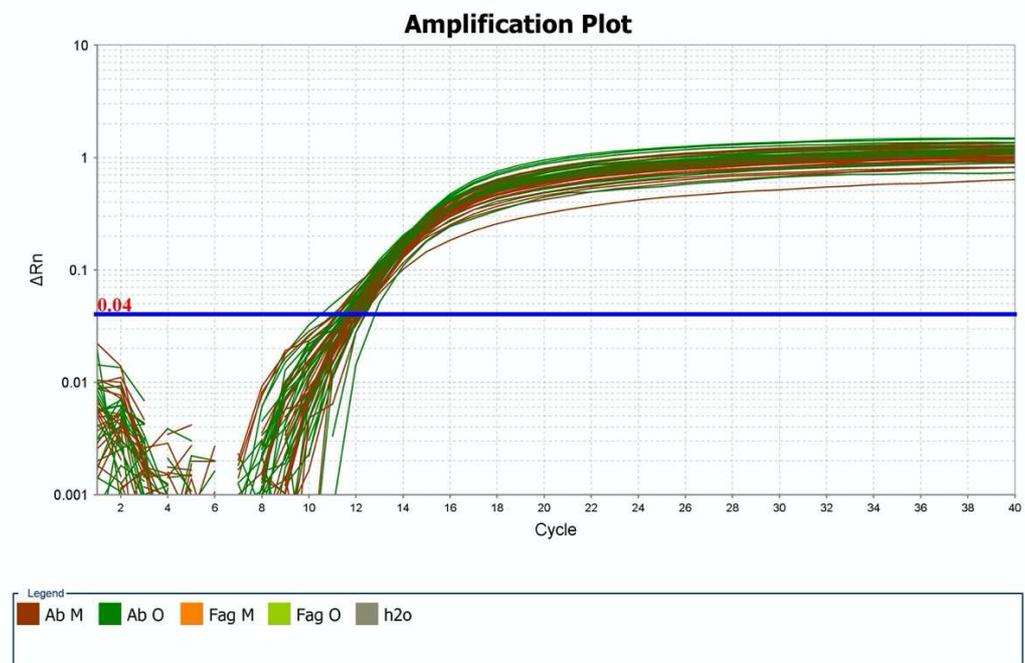
- Smil, V. (2004). *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT press.
- Staňková, P., Tahovská, K., & Šantrůčková, H. (2015). Anthropogenic impact on nitrogen transformation in spruce forests of central European mountains-a review. *Silva Gabreta*, 21.
- Strickland, M. S., & Rousk, J. (2010). Considering fungal: bacterial dominance in soils—methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1385-1395.
- ThermoFisher: Qubit Fluorometric Quantification System Features.  
<https://www.thermofisher.com/> .
- Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 56(3), 782-787
- Varma, A., & Choudhary, D. K. (Eds.). (2019). *Mycorrhizosphere and pedogenesis*. Springer.
- Wang, Z., & Fernandez, I. (1999). Soil type and forest vegetation influences on forest floor nitrogen dynamics at the Bear Brook Watershed in Maine (BBWM). *Environmental Monitoring and Assessment*, 55, 221-234.
- Wang, Z., Feng, K., Wei, Z., Wu, Y., Isobe, K., Senoo, K., ... & Deng, Y. (2022). Evaluation and redesign of the primers for detecting nitrogen cycling genes in environments. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(9), 1976-1989.
- Zanardo, M., Rosselli, R., Meneghesso, A., Sablok, G., Stevanato, P., Altissimo, A., ... & Squartini, A. (2016). Dynamics of soil prokaryotes catalyzing nitrification and denitrification in response to different fertilizers in a greenhouse experiment with *Cynodon dactylon*. *European Journal of Soil Biology*, 76, 83-91.
- Zanella, A., Tomasi, M., De Siena, C., Frizzera, L., Jabiol, B., Nicolini, G., ... & Odasso, M. (2001). *Humus forestali: manuale di ecologia per il riconoscimento e l'interpretazione: applicazione alle faggete*. Centro di ecologia alpina.
- Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical reviews*, 120(12), 5308-5351
- Zilio, M., Motta, S., Tambone, F., Scaglia, B., Boccasile, G., Squartini, A., & Adani, F. (2020). The distribution of functional N-cycle related genes and ammonia and nitrate nitrogen in soil profiles fertilized with mineral and organic N fertilizer. *PLoS One*, 15(6), e0228364.

## Appendice

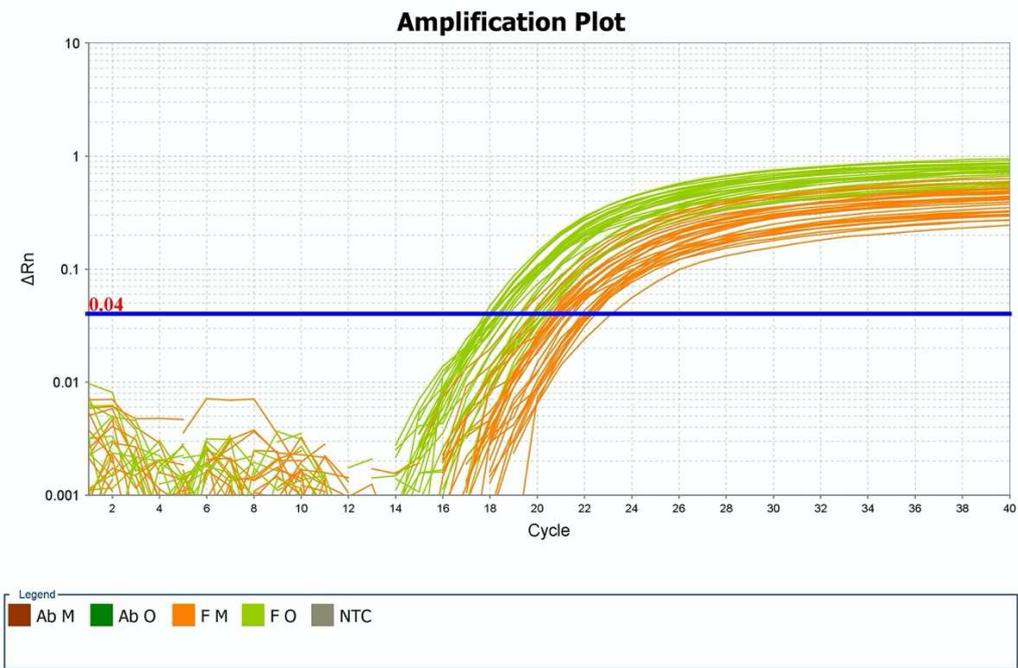
In questa sezione vengono riportati materiali grafici e fotografici accessori per una più accurata comprensione dello studio.



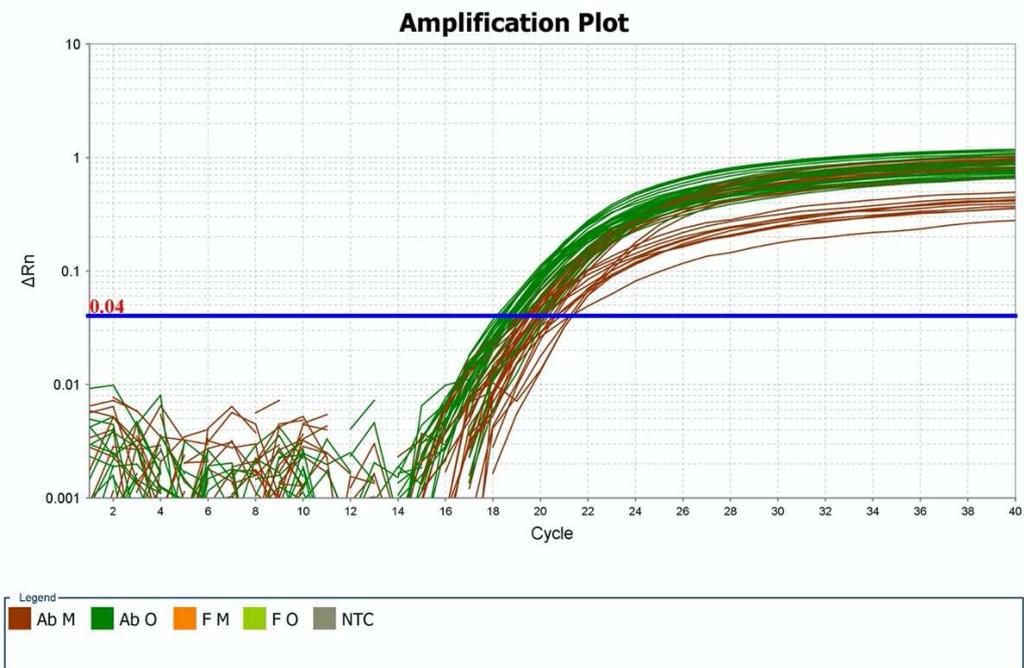
*Curve di amplificazione del gene 16S, risultato della qPCR sui campioni del faggio*



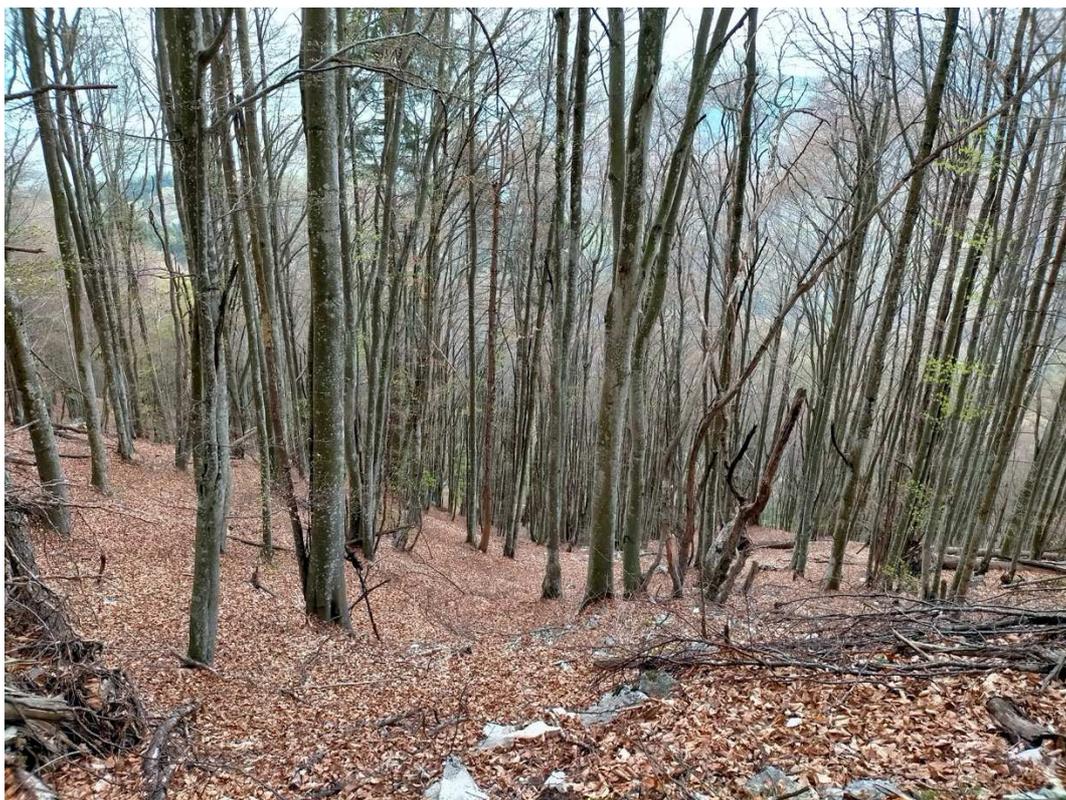
*Curve di amplificazione del gene 16S, risultato della qPCR sui campioni dell'abete rosso*



*Curve di amplificazione del gene ITS2, risultato della qPCR sui campioni del faggio.*



*Curve di amplificazione del gene ITS2, risultato della qPCR sui campioni dell'abete rosso.*



*Visione laterale della struttura verticale dei popolamenti*



*Visione della copertura delle chiome di entrambi i popolamenti*