

# RELAZIONE TRA IL PASCOLAMENTO BOVINO, MICROBIOLOGIA DEL SUOLO E CICLI DEI NUTRIENTI NEI PASCOLI DI ALTA QUOTA

**Raniolo S., Squartini A., Ramanzin M., Sturaro E.**

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE NATURALI E AMBIENTE -  
Università di Padova

## Riassunto

Il seguente lavoro illustra un approccio esplorativo per quanto riguarda la caratterizzazione dei pascoli d'alta quota dal punto di vista della microbiologia funzionale del suolo legata al ciclo dell'azoto. Lo studio si è svolto in due anni, dal 2018 al 2019, coinvolgendo 4 differenti pascoli tra il Trentino e il Veneto. Sono stati prelevati campioni di topsoil, da cui è stato successivamente estratto e purificato il DNA. Il DNA estratto è stato amplificato attraverso l'applicazione della real-time PCR con primer per geni target legati ai processi di nitrificazione e denitrificazione. I geni studiati sono stati i *nosZ* per la denitrificazione e gli *amoA*, variante archea e batterica, per la nitrificazione. L'analisi statistica si è basata sulla valutazione della presenza e assenza dei geni nelle aree studio nei diversi periodi considerati. Sono state evidenziate differenze tra i geni nitrificanti e denitrificanti in continuità durante i due anni della prova. I geni *amoA* sono risultati essere legati a fattori morfologici locali, come la quota, mentre i *nosZ* no. Quest'ultimi presentano inoltre una minor variabilità, presentandosi con maggior costanza, rilevando come i pascoli di alta quota abbiano un buon potenziale di denitrificazione.

## Abstract

***Relationship among cattle grazing, soil microbiology and nutrient cycles in high altitude pastures*** - The following work illustrates an exploratory approach as regards the characterization of high altitude pastures from the point of view of the functional soil microbiology, linked to the nitrogen cycle. The study took place over two years, from 2018 to 2019, involving 4 different pastures between Trentino and Veneto. Topsoil samples were taken, from which DNA was subsequently extracted and purified. The extracted DNA was amplified through the application of real-time PCR with primer for target genes related to nitrification and denitrification processes. The genes studied were the *nosZ* for denitrification and the *amoA*, archaea and bacterial variant, for nitrification. The statistical analysis was based on the evaluation of the presence and absence of genes in the study areas in the various periods considered. Differences were observed between nitrifying and denitrifying genes during the two years of the test. *AmoA* genes are found linked to local morphological factors, such as altitude, while *nosZ* do not. These also show less variability, appearing with greater constancy, taking over that high altitude pastures have good denitrification potential.

## Introduzione

I pascoli sono agroecosistemi capaci di offrire numerosi servizi e beni ecosistemici, che li rendono sistemi dall'elevato valore naturale, classificabili come High Nature Value Farmalands (HNVF). Questi sistemi si sviluppano su aree dalla bassa vocazione agronomica, come possono essere le aree

montane presenti nelle Alpi. Questa tipologia di agroecosistema si avvicina molto a quello naturale delle praterie, che sono tra gli ecosistemi più diffusi al mondo, ricoprendo circa il 40% delle terre emerse. Gli ecosistemi prativi contengono circa il 10% della biomassa terrestre e contribuiscono tra il 20% e 30% all'insieme del carbonio organico del suolo globale (Zhong et al., 2015). Questi sistemi, pertanto, rivestono un potenziale ruolo nella mitigazione del cambiamento climatico grazie al sequestro di anidride carbonica atmosferica sotto forma di carbonio stabile nel suolo. In questi sistemi, come in ogni ecosistema e agroecosistema terrestre, la comunità microbica del suolo è la base per la conversione, uso e riciclo dei nutrienti. Essa risulta essere fortemente influenzata dal pH, l'umidità, il carbonio organico del suolo (SOC), l'azoto presente e dal rapporto tra questi due elementi (Kuypers et al., 2018).

Questi parametri chimico-fisici risultano essere condizionati fortemente dalla vegetazione, che può modificare la struttura del suolo per mezzo delle radici, la chimica attraverso il rilascio di essudati radicali e il microclima (Li et al., 2016). Il pascolamento agisce come disturbo negli ecosistemi prativi, come i pascoli, causando l'alterazione diretta della vegetazione, del suolo per mezzo della compattazione dovuta dal calpestamento e delle immissioni di azoto tramite le deiezioni (Abdalla et al., 2018). Queste alterazioni possono avere effetti sia diretti che indiretti sulla comunità microbica del suolo con possibili ripercussioni sui cicli biogeochimici dei nutrienti. Per quanto concerne il ciclo dell'azoto, nei suoli in presenza di pascolamento, sono stati riscontrati incrementi nei tassi di nitrificazione e denitrificazione in termini di abbondanza di geni *amoA* e *nosZ* grazie all'aumento di substrato azotato introdotto con le deiezioni (Zhong et al., 2015).

Questi due geni possono essere considerati dei marker molecolari funzionali, utilizzabili nella caratterizzazione di processi biologici d'interesse ambientale, legati al ciclo dell'azoto, attraverso tecniche d'indagine quantitative come la realtime-PCR (Cao et al., 2011; Cavagnaro et al., 2008). Il gene *amoA* codifica per la subunità alfa dell'enzima AMO o Ammonio Monossigenasi, che catalizza l'ossidazione dell'ammonio in idrossilammia ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), intermediario nella nitrificazione. Questo gene è stato largamente ritrovato in molti ambienti differenti: suoli, fiumi e oceani. L'Ammoniaca Monossigenasi è presente sia tra i batteri (AOB) che gli Archea (AOA) in due forme distinte, che richiedono l'adozione di diversi primer per essere studiati. Il gene *nosZ* codifica per l'enzima ossido nitroso reductasi (N2OR), appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, e capace di ridurre il protossido di azoto ad azoto molecolare. La caratterizzazione nel suolo del gene *nosZ* permette di delineare il potenziale di riduzione del perossido di azoto in azoto molecolare (Orellana et al., 2014).

Questo studio consiste in un'analisi preliminare dei pascoli d'alta quota alpini da un punto di vista microbiologico, con il fine di caratterizzarne il

potenziale di nitrificazione e denitrificazione in relazione alla presenza o assenza dei geni *amoA* e *nosZ*. I geni quindi sono stati considerati come possibili indicatori biofisici per servizi ecosistemici di supporto legati all'attività zootecnica alpina.

## Materiale e metodi

La sperimentazione è stata svolta in due malghe durante il 2018, rispettivamente Malga Juribello e Ombretta, mentre nel 2019 sono state coinvolte tre malghe, Malga Juribello, Venegiota e Vallazza. Queste tre malghe sono situate all'interno del Parco Naturale Paneveggio Pale di San Martino, mentre malga Ombretta si trova nell'omonima valle dietro il versante sud della Marmolada in Veneto. Le malghe scelte differenziano tra loro per le caratteristiche pedologiche, per il numero e le razze di capi allevati. Le principali caratteristiche dei quattro pascoli studiati sono riportati nella tabella 1.

**Tabella 1** - Principali caratteristiche dei pascoli seguiti nella prova tra il 2018 e 2019

MALGA	CAPI	RAZZE	ALTITUDINE (min – max – media)			SUOLO
<b>Juribello</b>	150 vacche produttive	Bruna	1816	2237	1969	Cambisol Podzol
		Pezzata				
		Rossa				
<b>Vallazza</b>	41 vacche produttive	Bruna/Grigio	1672	2181	1961	Umbrisol
		Alpina				
<b>Venegiota</b>	78 vacche produttive	Bruna	1764	1993	1866	Leptosol
		Grigio				
<b>Ombretta</b>	25 vacche produttive	Alpina	1809	2159	1963	Leptosol
		Pezzata				
		Rossa				

La prova si è differenziata nei due anni con l'utilizzo di 9 gabbie di esclusione di un metro quadro di superficie durante il secondo anno. Le gabbie sono state adottate per tentare di rilevare possibili differenze tra aree pascolate e non, fungendo quindi da controllo. Al fine di determinare le aree più pascolate sono stati utilizzati dei collari GPS, ricavando informazioni

riguardo il comportamento degli animali al pascolo. A fronte di queste informazioni sono stati selezionati per il primo anno 8 siti nel pascolo di malga Ombretta e 7 in quello di Juribello; durante il secondo anno invece sono stati selezionati 3 siti per ciascun pascolo monitorato, posizionando per ognuno di essi una gabbia di esclusione così da introdurre il possibile controllo. Per ogni sito e gabbia sono state svolte tre repliche in diversi periodi. Durante il primo anno i periodi considerati sono stati due: uno prima della monticazione e uno durante essa, nel mezzo di luglio. Per quanto riguarda il secondo anno invece i periodi sono stati incrementati, passando da due a quattro: uno pre-monticazione e tre durante tutto l'arco della monticazione, terminando a fine agosto.



**Figura 1** - Campionamento di topsoil e gabbie di esclusione usate durante la prova del 2019

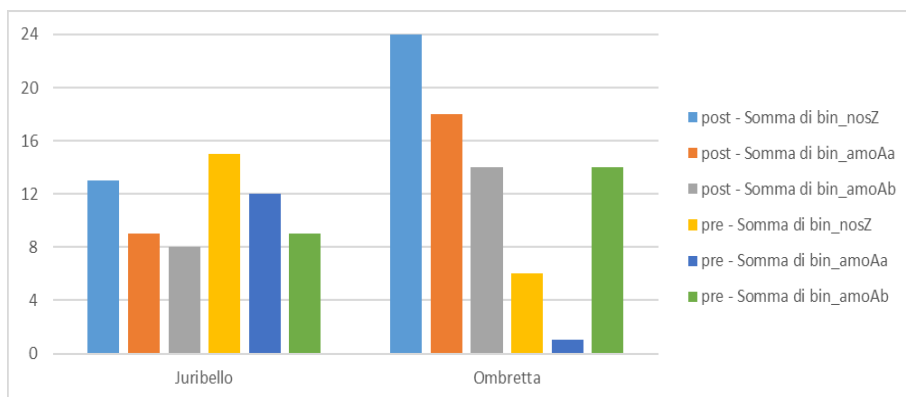
Il campionamento per la prova è consistito nel prelievo di carote di suolo superficiale, nello specifico dei primi 10 cm. Si è quindi caratterizzata la comunità microbica del topsoil. I campioni di topsoil raccolti sono stati essiccati, tritati e setacciati con una maglia da 500 micron al fine di ridurre la tessitura, così da aumentare la superficie specifica del suolo e facilitare l'estrazione del DNA. Questa si è basata sulla lisi delle cellule tramite l'aggiunta di NaP come buffer estraente, insieme a delle microbiglie di ceramita. Il processo di lisi è stato omogenizzato attraverso l'uso del TissueLyser II, impostato per esercitare oscillazioni a 30Hz per 5 minuti. Il DNA così estratto a crudo è stato poi purificato con il sistema automatizzato

Biosprint. Il DNA estratto e purificato è stato oggetto di un'amplificazione per mezzo di PCR real-time al fine di quantificare i geni *amoA* e *nosZ*. Per i geni *amoA* sono stati utilizzati due differenti tipi di primer, uno specifico per gli archea e l'altro per i batteri. La mix usata per l'amplificazione è stata la Master Mix SYBR, mentre il termociclatore è stato impostato a 95°C per la denaturazione, 57° C e 60°C per l'annealing a 1 minuto e 72° C per l'allungamento. Durante l'holding stage, la fase di denaturazione è durata 10 minuti, mentre per i successivi cicli 15 secondi. La stima delle copie geniche attraverso real-time PCR è stata effettuata partendo dai valori di cicli soglia (Ct), che sono inversamente proporzionali alla quantità di DNA presente nel campione e delineano l'inizio della fase logaritmica dell'amplificazione. I cicli soglia sono stati convertiti in stime di copie geniche attraverso delle curve di calibrazione specifiche per singolo gene (Sims et al., 2012; Zanardo et al., 2016).

I dati ottenuti sono stati analizzati a livello statistico con l'applicazione di modelli lineari generalizzati. L'intero dataset è stato trasformato secondo una distribuzione binomiale, andando quindi a valutare la presenza e assenza dei singoli geni. L'assenza di copie geniche è stata tratta come 0, mentre il valore 1 è stato assegnato a tutti i campioni per cui è stato possibile stimare dei valori non nulli. L'analisi ha visto l'applicazione di un modello generalizzato lineare basato sulla famiglia di distribuzione binomiale con il software R. I modelli hanno valutato gli effetti del pascolo, del periodo, dell'interazione tra pascolo e periodo e in fine della quota rispetto ogni singolo gene.

## Risultati e discussione

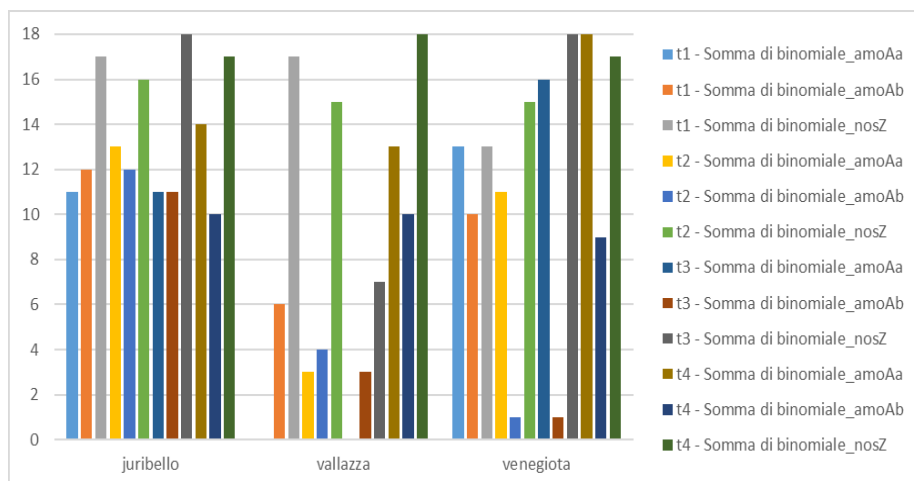
L'analisi delle presenze delle copie geniche non ha mostrato risultati differenti rispetto i due anni. Nel 2018 anno la probabilità di presenza dei geni ha dato risultati differenti tra i *nosZ* e gli *amoA*: i primi non hanno presentato alcun fattore significativo, mentre per i secondi si sono riscontrati dei fattori di variabilità. Per i geni *amoA* archea sono stati confermati come fattori di variabilità significativi il pascolo (p-value < 0.05), la quota (p-value < 0.05) e l'interazione pascolo e periodo (p-value < 0.001). Per il gene *amoA* bacteria invece la probabilità di presenza è risultata essere legata a due fattori di variabilità: la quota (p-value < 0.001) e il pascolo (p-value < 0.05). Il grafico riportato in figura 2 mostra le presenze totali per singolo gene rispetto i due periodi e pascoli. Il massimo di presenza possibile corrisponde al numero di campioni raccolti per singolo pascolo, ossia 21 per Juribello e 24 per Ombretta.



**Figura 2** - Istogramma delle Presenze per singolo gene rispetto al pascolo e periodo durante la prova del 2018

Per il secondo anno della prova l'analisi della probabilità di presenza dei geni ha rilevato come i geni *nosZ* non abbiano alcun fattore significativo di variabilità, a differenza dei geni *amoA*. Questi hanno entrambi condiviso la quota come principale fattore di variabilità (*amoA* archea - p-value < 0.001, *amoA* bacteria - p-value < 0.001), insieme al pascolo (*amoA* archea - p-value < 0.001, *amoA* bacteria - p-value < 0.001). Non è stata rilevata alcuna significativa differenza tra i campioni all'interno delle gabbie di esclusione rispetto a quelli esterni. L'assenza di significatività è probabilmente dovuta dal costante utilizzo di tutta la superficie del pascolo durante il periodo di monticazione nel corso degli ultimi anni. Questo trend di utilizzo è stato confermato dal monitoraggio di alcuni capi in tutti i pascoli considerati durante l'intero arco della monticazione. Questo può fornire una possibile spiegazione all'assenza di significativa variabilità rispetto al fattore periodo, specie durante la prova del 2019, che ha coinvolto pascoli utilizzati con costanza da anni. Il grafico riportato in figura 3 mostra gli andamenti delle totali presenze per gene, rispetto il singolo periodo e pascolo.

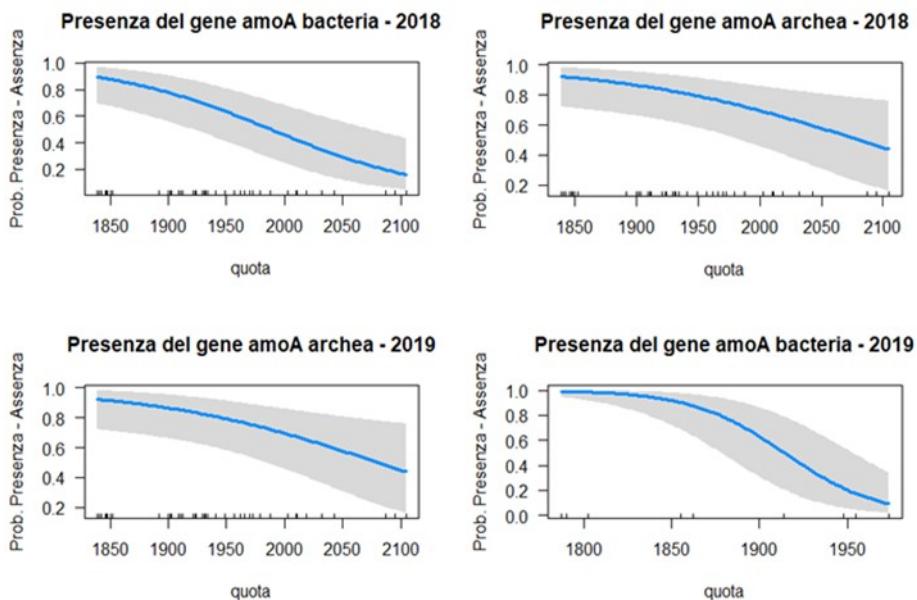
Il massimo di presenza possibile corrisponde al numero di campioni effettuati, ossia 18.



**Figura 2** - Istogramma delle Presenze per singolo gene rispetto al pascolo e periodo durante la prova del 2019

Dalle figure 2 e 3 si può evincere come la presenza di geni *nosZ* e *amoA* sia pressoché costante per il pascolo di malga Juribello in entrambi gli anni e meno soggetta a variazioni tra i periodi considerati a differenza degli altri. Questo pascolo è quello con il maggior numero di capi e il suo utilizzo risulta essere costante da un lungo periodo di tempo.

In accordo con i dati bibliografici, i pascoli studiati hanno mostrato una costante presenza di geni legati al potenziale sia di denitrificazione e nitrificazione (Zhong et al., 2015). I fattori di variabilità per quanto riguarda il potenziale di nitrificazione del suolo, ossia la presenza dei geni *amoA*, sembrano essere legati maggiormente alle condizioni morfologiche, come la quota. In presenza di significativa variabilità riguardo la quota, la correlazione, che lega il fattore ambientale con la presenza del gene, è negativa come si può evincere dalla figura 4. Questo andamento discordante rivela un gradiente, che vede la massima probabilità di presenza dei geni *amoA* alle quote minori. Per quanto riguarda i geni *nosZ*, legati al potenziale di denitrificazione del suolo, non sono stati riscontrati fattori di significativa variabilità legati alla morfologia del pascolo.



**Figura 4** - Rappresentazione dell'andamento delle distribuzioni di probabilità di presenza - assenza per i geni *amoA* rispetto la quota durante le prove del 2018 e 2019

## Conclusioni

I risultati ottenuti da questo approccio sperimentale hanno rilevato che i geni della comunità microbica del suolo, *amoA* e *nosZ*, presentano una variabilità in termini di presenza. Le due tipologie di geni nel seguente caso studio hanno mostrato comportamenti differenti. I geni legati al potenziale di denitrificazioni si sono rivelati essere costantemente presenti nei pascoli e indipendenti da fattori ambientali morfologici, come la quota. I geni *amoA*, legati invece alla nitrificazione, hanno mostrato una maggior variabilità in termini di presenza, specie rispetto alla quota. Questo può trovare una plausibile spiegazione nei fenomeni di lisciviazione dei composti azotati nel suolo con verosimili flussi superficiali e sotterranei dalle quote più alte a quelle più basse, dove può essere possibile un accumulo di esse. Questo permetterebbe una maggior presenza di substrato per i geni *amoA* con un conseguente loro incremento. La presenza pressoché costante del gene *nosZ* invece rivela come i pascoli siano agroecosistemi dal potenziale di denitrificazione, quindi dalle ridotte emissioni di protossido di azoto. La variabilità emersa non è facilmente spiegabile a causa dei numerosi fattori presenti nell'agroecosistema del pascolo, a partire dal pascolamento



stesso. Non è possibile a fronte della prova effettuata delineare il pascolamento come fattore significativo per la struttura della comunità pedologica del suolo. Rispetto i risultati ottenuti, tuttavia, è verosimile affermare come i pascoli siano sistemi capaci di garantire servizi ecosistemi di supporto, come la denitrificazione, e dalle ridotte emissioni di specie gassose clima-alteranti. Il mantenimento di questi agroecosistemi attraverso la pratica della monticazione quindi può essere importante non solo a livello paesaggistico e culturale, ma soprattutto da quello ecologico per le funzioni legate ad esso.

## Bibliografia

- Abdalla, M., Hastings, A., Chadwick, D. R., Jones, D. L., Evans, C. D., Jones, M. B., . & Smith, P. (2018). Critical review of the impacts of grazing intensity on soil organic carbon storage and other soil quality indicators in extensively managed grasslands. *Agriculture, ecosystems & environment*, 253, 62-81
- Cao, H., Li, M., Hong, Y., & Gu, J. D. (2011). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. *Systematic and applied microbiology*, 34(7), 513-523
- Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Scow, K. M., & Hristova, K. R. (2007). Effects of arbuscular mycorrhizas on ammonia oxidizing bacteria in an organic farm soil. *Microbial Ecology*, 54(4), 618-626
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263.
- Li, Y., Lin, Q., Wang, S., Li, X., Liu, W., Luo, C., ... & Li, X. (2015). Soil bacterial community responses to warming and grazing in a Tibetan alpine meadow. *FEMS microbiology ecology*, 92(1), fiv152
- Orellana, L. H., Rodríguez-R, L. M., Higgins, S., Chee-Sanford, J. C., Sanford, R. A., Ritalahti, K. M., ... & Konstantinidis, K. T. (2014). Detecting nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in soil metagenomes: method development and implications for the nitrogen cycle. *MBio*, 5(3), e01193-14
- Sims, A., Horton, J., Gajaraj, S., McIntosh, S., Miles, R. J., Mueller, R., ... & Hu, Z. (2012). Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. *Water research*, 46(13), 4121-4129
- 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
- Zhong, L., Bowatte, S., Newton, P. C., Hoogendoorn, C. J., Li, F. Y., Wang, Y., & Luo, D. (2015). Soil N cycling processes in a pasture after the cessation of grazing and CO<sub>2</sub> enrichment. *Geoderma*, 259, 62-70

