Università degli Studi di Napoli Federico II
Facoltà di Agraria
Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica

Effetto della biodiversità microbica su alcune funzioni ecosistemiche

Dottoranda **Manuela Capodilupo**
Tutore **Prof. Matteo lorito**
Co-tutore **Dott. Giuliano Bonanomi**

INDICE

Capitolo 1
Introduzione

1.1 Lo studio della biodiversità e funzioni ecosistemiche……6

1.2 Teorie ed approcci sperimentali……..8

1.3 Diversità e funzionalità: effetto campionamento, facilitazione e complementarietà nella nicchia ecologica……..……12

1.4 I gruppi funzionali…….....17

1.5 La diversità microbica del suolo……...19

1.5.1 Relazione tra biodiversità microbica e funzionalità dell'agroecosistema……21

1.5.2 Fattori ecologici che influenzano la diversità microbica del suolo……...…25

1.5.3 Metodi e tecniche per lo studio della diversità microbica tellurica……...27

1.5.3.1 Conte dirette su substrati selettivi e metodi biochimici…….…….....28

1.5.3.2 Approcci molecolari……..28

1.5.3.3 Tecniche per manipolare sperimentalmente la diversità microbica……...33

1.6 Obiettivi della tesi…….…35

1.7 Referenze citate……...……37

Capitolo 2

Diversità microbica e decomposizione della lettiera

2.1 Il processo di decomposizione……...49

2.1.1 I microrganismi decompositori……50

2.1.2 Diversità della lettiera e decomposizione……54

2.1.3 Diversità microbica e decomposizione della lettiera……..…56

2.1.4 Obiettivi dello studio……59

2.2 Materiali e Metodi……..60

2.2.1 Effetto della diversità microbica sulla decomposizione della lettiera……..……..…60

2.2.1.1 Selezione e caratterizzazione chimica dei substrati organici……..……..60

2.2.1.2 Selezione dei microrganismi……..61

2.2.1.3 Identificazione molecolare delle specie fungine……63

2.2.1.4 Disegno sperimentale e assemblaggio delle comunità microbiche……..…….64

2.2.1.5 Analisi dei dati……...70

2.2.2 Esperimento di decomposizione di lettiere miste……71

2.3 Risultati……..…73

2.3.1 Caratterizzazione chimica dei substrati organici……73

2.3.2 Diversità microbica e decomposizione……...75

2.3.2.1 Effetto della qualità della lettiera e della temperatura sulla decomposizione……..…….75

2.3.2.2 Effetto della diversità microbica fungina sulla decomposizione……...……77

2.3.2.3 Effetto della diversità microbica batterica sulla decomposizione……...…….80

2.3.2.4 Effetto della diversità di consorzi composti da

funghi e batteri sulla decomposizione..……..82
2.3.2.5 Diversità microbica e stabilità della decomposizione...83
2.3.2 Esperimento di decomposizione di lettiere miste……85
2.4 Discussioni…….88
2.4.1 Effetto della diversità microbica sulla decomposizione……..88
2.4.2 Effetto della diversità della lettiera sulla decomposizione…..95
2.5 Referenze citate……100

Capitolo 3

La fungistasi

3.1 La fungistasi…….……110
3.2 I suoli soppressivi…….114
3.3 Obiettivi dello studio……119
3.4 Materiali e Metodi……120
3.4.1 Assemblaggio delle comunità microbiche……..…120
3.4.2 Selezione dei materiali organici ed esperimento di decomposizione…...……...……..…122
3.5 Risultati……123
3.6 Discussione……..128
3.7 Referenze citate……130

Capitolo 4

Invasibilità di consorzi microbici da parte di specie microbiche aliene

4.1 Le invasioni biologiche……136
4.2 Meccanismi di invasione biologica: invasività dei microrganismi e invadibilità delle comunità…….……...138

4.3 Relazione tra biodiversità ed invadibilità delle comunità……140
4.4 Invadibilità delle comunità: ruolo delle disponibilità di risorse e degli stress ambientali……...141
4.5 Obiettivi dello studio…….……143
4.6 Materiali e metodi…….……144
4.6.1 Diversità microbica e invasioni biologiche……144
4.6.1.1 Selezione dei microrganismi ed assemblaggio delle comunità sintetiche……..……....144
4.6.1.2 Invasione di residui vegetali…….……146
4.6.1.3 Invasione della rizosfera……..….147
4.7 Risultati…….150
4.7.1 Invasione di residui vegetali……..150
4.7.2 Invasione della rizosfera……....151
4.8 Discussioni……...…153
4.9 Referenze citate……155

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1. Lo studio della biodiversità e delle funzioni ecosistemiche

La biodiversità e le sue origini suscitano da sempre un grande interesse (Darwin 1862; Hutchinson 1959) nel mondo scientifico e negli ultimi vent'anni è aumentata notevolmente l'attenzione verso le sue conseguenze sull'ecosistema (Tilman 1999). Il termine *biodiversità* è la forma abbreviata di "diversità biologica" e può riferirsi al numero di entità (genotipi, varietà, specie biologiche) presenti in un ecosistema, incluse le differenze nei loro tratti funzionali e nelle loro interazioni (Hooper et al. 2005). A partire dagli anni '60, il campo dell'ecologia si è orientato verso un'intensa ricerca volta ad identificare i meccanismi che permettono la coesistenza delle specie e quindi il mantenimento della biodiversità (Huston 1994; Wright 2002; Mazzoleni et al. 2007). Molti studiosi affermarono che la biodiversità, definita semplicemente come il numero di specie presenti in un sistema, oltre ad essere un indicatore della produttività e della stabilità di una comunità, è legata ad importanti processi ecologici come la ripartizione delle risorse, la competizione, la facilitazione interspecifica e le successioni (Odum 1969; Lubchenco 1978; Callaway 2007).

Particolare attenzione è stata posta negli ultimi anni alle relazioni esistenti tra biodiversità e funzionalità degli ecosistemi (Hector et al. 1999). Una funzione ecosistemica è la capacità di un sistema e delle sue componenti di effettuare processi ecologici e di fornire beni e servizi per soddisfare i bisogni dell'uomo, in maniera diretta e indiretta. In letteratura si fa riferimento ad un gran numero di funzioni e beni e servizi ad esse

associati che possiamo raggruppare in tre categorie principali (de Groot et al. 2002):

1) ***Funzioni di regolazione***. Questo tipo di funzioni si riferiscono alla capacità di ecosistemi naturali e semi-naturali di regolare processi ecologici essenziali attraverso cicli biogeochimici e altre attività. Oltre a garantire la salute dell'ecosistema, tali funzioni di regolazione forniscono benefici diretti e indiretti all'uomo (regolazione del bilancio del carbonio, funzionalità dello strato ozono, regolazione del clima, regolazione del ciclo delle acque, ritenzione e protezione del suolo, formazione del suolo, regolazione del ciclo dei nutrienti, controllo biologico di specie invasive e patogene;
2) ***Funzioni relative alla formazione e protezione dall'habitat.***
3) ***Funzioni ricreative e di informazione***.

L'indagine scientifica sulle origini e sulla conservazione della biodiversità e del suo impatto sulle funzioni ecosistemiche è stata promossa da iniziative di notevole importanza proposte dagli istituti di ricerca di molti paesi. La Convenzione sulla diversità biologica firmata dalla Comunità europea e da tutti gli Stati membri nel corso della Conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente e lo sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro nel giugno del 1992, ha promosso la conservazione della biodiversità biologica in considerazione del suo valore intrinseco e dei suoi valori ecologici, genetici, sociali, economici, scientifici, educativi, culturali, ricreativi ed estetici. In un momento in cui, a seguito di attività antropiche, la distribuzione e l'abbondanza della biodiversità subiscono una drammatica riduzione a scala locale e globale (Wilson 1993; Fig. 1.1.), riuscire a prevedere le conseguenze di tali modificazioni è diventato ormai un tema fondamentale dell'ecologia moderna. Questo argomento richiede un approccio multi-disciplinare che integra tra loro campi come la botanica, la zoologia, la chimica, la microbiologia, la fisica e la geologia.

1.2. Teorie ed approcci sperimentali

L'ambiente e gli ecosistemi sono il risultato di complesse attività biotiche ed abiotiche. La biosfera è un sistema vasto, complesso e dinamico costituito da 10-100 milioni di specie che condividono lo spazio da 3,5 miliardi di anni e che attualmente occupano virtualmente 5,1 x 10^{14} m^2 della superficie della Terra e dell'acqua (Loreau et al. 2002).

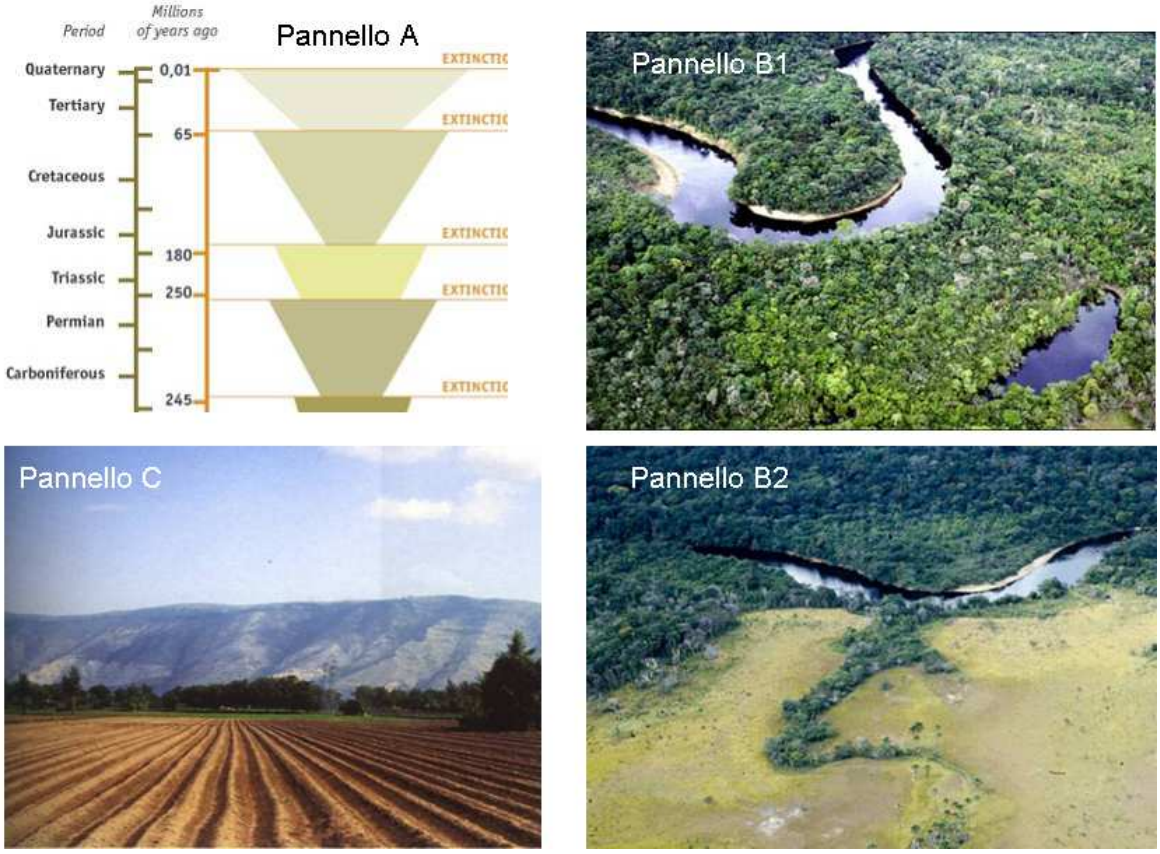

Figura 1.1. La terra nelle diverse ere geologiche ha subito cinque grandi estinzioni di massa di specie biologiche (Pannello A; Wilson 1993). Tali estinzioni sono state originate da cause naturali. Negli ultimi secoli stiamo assistendo alla sesta estinzione di massa di specie biologiche: tale fenomeno è determinato dalla diffusione delle attività antropiche ed in particolare ai cambiamenti nell'uso del suolo come la deforestazione (Pannello B1 e B2) oltre che alla sempre maggior semplificazione degli agro ecosistemi (Pannello C).

Conseguentemente, per comprendere il funzionamento del sistema Terra non basta conoscere i cicli biogeochimici (Odum 1969), ma è necessario

comprendere il ruolo che la biodiversità ricopre in questo complesso apparato. Solo recentemente, però, la scienza degli ecosistemi è diventata un branca in via di espansione nell'ambito dell'ecologia, fondendo insieme due discipline: l'ecologia delle comunità e l'ecologia degli ecosistemi. Alla conferenza di Bayreuth, in Germania, organizzata da Schulze e Mooney nel 1991, gli ecologi tentarono di sintetizzare tutto quello che si sapeva sulla relazione tra biodiversità e funzioni ecosistemiche. Nella conferenza di Bayreuth si sviluppo l'idea, successivamente formalizzata da Hooper & Vitousek nel 1998 (Fig. 1.2.), che la biodiversità è legata e determina la funzionalità degli ecosistemi (Schlapfer & Schmid 1999; Cardinale et al. 2000). Apparentemente è un'idea molto semplice, rappresentabile graficamente come una curva che si sviluppa tra due punti. Il primo, l'origine degli assi, rappresenta il punto a biodiversità nulla e in corrispondenza del quale anche la funzione assume un valore nullo. Il secondo punto rappresenta il livello naturale di biodiversità, dove prevedibilmente la funzione assumerà un valore molto alto. Quindi, ogni funzione ecosistemica può essere diversamente influenzata dalla perdita o dall'aumento di biodiversità (Fig. 1.2). Per spiegare le diverse relazioni osservate, appartenenti a tre classi principali (lineare, ridondante, idiosincratica), sono state avanzate numerose ipotesi (revisione in Hooper et al. 2005).

Ad oggi la relazione che lega la biodiversità con le funzioni ecosistemiche è stata indagata soprattutto nell'ambito delle comunità vegetali (Tilman et al. 1999). La maggior parte dei lavori sperimentali relativi agli effetti della diversità delle piante sull'ecosistema riguardano infatti la produzione primaria vegetale (Hector et al. 1999; Tilman et al. 2001) e il ciclo dei nutrienti nell'ecosistema (Hooper & Vitousek 1998). Anche le conseguenze della diversità biologica sul processo di decomposizione (revisione in Gartner & Cardon 2004; Hättenschwiler et al.

2005; vedi Capitolo 2), le invasioni biologiche (Pimentel et al. 2000; vedi Capitolo 4) e le dinamiche delle sostanze nutritive nel suolo sono state studiate (Tabella 1.1).

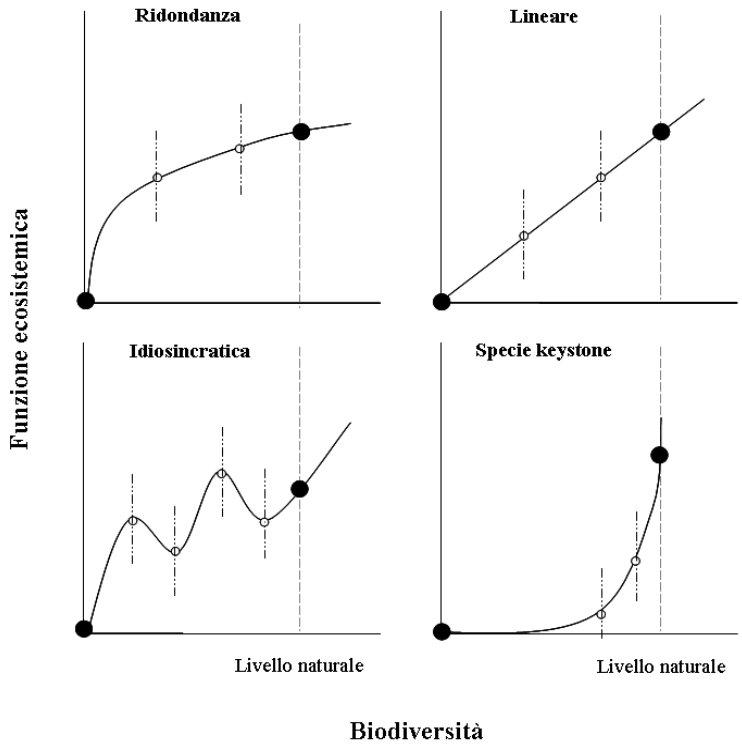

Figura 1.2. Relazioni fra biodiversità e funzioni ecosistemiche proposte da Hooper & Vitousek (1998). Notare che in tutti i casi, sebbene la funzione incrementale sia differente, si rileva un incremento della funzionalità degli ecosistemi con la diversità biologica.

Da numerosi studi sia di tipo descrittivo che sperimentale è stata osservato che la funzionalità degli ecosistemi, ed in primis la produttività primaria di sostanza organica da parte dei vegetali, tende ad aumentare con la diversità biologica (Hooper et al. 2005). Sebbene l'esistenza di tali relazioni positive (Fig. 1.2) non sono ormai in discussione, poco chiari sono i meccanismi che determinano tali funzioni. In altre parole, per quale ragione gli ecosistemi con maggiore diversità sono più produttivi e più funzionali?

Tabella 1.1. Elenco di alcuni studi che hanno indagato la relazione fra biodiversità e funzioni ecosistemiche. Notare che non ci sono studi volti ad analizzare la relazione fra diversità microbica e soppressivvità verso i patogeni delle pianti (vedi Capitolo 4 per dettagli).

Funzione ecosistemica	Referenze	Note
Produttività primaria	Trenbath 1974; Hector et al. 1999; Tilman et al. 2001	La produttività primaria cresce con il crescere del numero delle specie vegetali presenti nell'ecosistema.
Diversità della lettiera e decomposizione	Hector et al. 2000; Gartner & Cardon 2004; Hättenschwiler et al. 2005; Bonanomi et al. 2010a	Il tasso di decomposizione è influenzato in maniera idiosincratica dal numero di lettiere. Comunque, sia effetti additiv, sinergici che antagonistici sono state osservati (vedi Capitolo 2)
Diversità microbica e decomposizione	Dang et al. 2005; Tiunov & Scheu 2005; Deacon et al. 2006	Gli esperimenti presenti in letteratura che hanno manipolato il numero di specie all'interno di comunità microbiche sintetiche hanno mostrato un effetto della diversità variabile sulla perdita di peso della sostanza organica, riportando delle relazioni positive, non significative o addirittura negative (vedi Capitolo 2)
Resistenza degli ecosistemi alle invasioni biologiche	Knops et al. 1999; Levine & D'Antonio 2000; Naeem et al. 2000; Hector et al. 2001	Numerosi studi hanno riportato che un aumento della ricchezza di specie di un ecosistema riduce il successo di invasione da parte di specie esotiche o invasive (vedi Capitolo 4).
Diversità e stabilità delle funzioni ecosistemiche	Cardinale et al. 2002; Callaway 2007	La stabilità della funzionalità degli ecosistemi, spesso quantificata con il coefficiente di variabilità, aumenta con la diversità (vedi Capitolo 2, 3 e 4).
Ciclo dei nutrienti	Tilman & Downing 1994; Hooper & Vitousek 1998	Comunità vegetali (praterie) con una maggiore diversità mostrano una maggior capacità di ritenzione di nutrienti, riducendo ad esempio la lisciviazione dei nitrati.
Interazioni tra diversità vegetale e microbica	Bardgett & Shine 1999; Wardle et al. 1999; Stephan et al. 2000	La diversità delle piante può alterare la composizione della comunità microbica del suolo che, a sua volta, può incrementare l'apporto di nutrienti alle piante con effetti positivi sulla produttività.
Produttività vegetale e diversità microbica	van der Heijden et al. 1998	All'aumento della diversità microbica del suolo (funghi micorrizzici) corrisponde un incremento della produttività primaria di praterie.

1.3. Diversità e funzionalità: effetto campionamento, facilitazione e complementarietà della nicchia ecologica

Oltre 150 anni fa l'acuto osservatore Charles Darwin scrisse "*… it has been experimentally proved, if a plot of ground be sown with one species of grass, and a similar plot be sown with several distinct genera of grasses, a greater number of plants and greater weight of dry herbage can be raised in the latter than the former case*" (Darwin 1862). Sebbene già Darwin notò che la diversità di erbe influenza positivamente la produzione di foraggio, ad oggi non è ancora chiara la causa del fenomeno.

In passato, lo studio delle consociazioni e le indagini in ambito agro-forestale sono state utili nel capire gli effetti della diversità sulle proprietà ecosistemiche (Trenbath 1974; Fridley 2001). Gli studi dagli anni '50 fino a fine anni '80 investigarono la relazione fra produttività primaria e diversità, considerando la diversità come una variabile dipendente dalla produttività e dalle differenti condizioni ambientali. Tale approccio era di tipo descrittivo e quindi fenomenologico. Dalla fine degli anni '80 tale approccio si è modificato ed è stato analizzato l'impatto della diversità nell'influenzare la produttività stessa. Questo approccio era volto a testare per via sperimentale le ipotesi di lavoro ed ad analizzare i meccanismi ipotizzati. Fra gli approcci di maggior successo scientifico, indubbiamente, possiamo annoverare l'utilizzo degli esperimenti che comparano comunità "sintetiche" con diversità crescente (Fig. 1.3; Tilman et al. 2001). Le comunità "sintetiche" non sono altro che ecosistemi assemblati a tavolino a partire da un pool di organismi (vegetali, animali, microbi) noti.

Figura 1.3. Immagini aeree di due importanti esperimenti allestiti per studiare le relazioni fra biodiversità vegetale e funzioni ecosistemiche.

Tale approccio sperimentale è stato utilizzato in pieno campo (Fig. 1.3; Tilman et al. 2001), ricreando ecosistemi completamente artificiali in mesocosmi (Fig. 1.4; Naeem et al. 1994) e in microcosmi utilizzando specie microbiche (McGrady-Steed, et al. 1997). Ad esempio, l'ECOTRON (Fig. 1.4) è un sistema di camere ad ambiente controllato e progettato per questo tipo di esperimenti.

Figura 1.4. Immagini del sistema ECOTRON sviluppato per studiare le relazioni fra biodiversità vegetale e funzioni ecosistemiche. Nelle camere sono stati ricostruiti artificialmente ecosistemi composti da ricchezza di specie e livelli trofici differenti e sotto completo controllo sperimentale (Naeem et al. 1994).

Naeem et al. (1994), utilizzando l'ECOTRON, manipolarono la diversità di piante e animali creando microcosmi a diversità bassa, intermedia ed alta con 9, 15 e 31 specie. Furono assemblati 14 microcosmi ciascuno di 1 m^2 posizionati a caso all'interno dell'ECOTRON. La temperatura e il flusso d'aria, l'umidità relativa, le condizioni iniziali del suolo, la densità iniziale degli organismi e il numero di livelli trofici erano gli stessi per tutte le camere. Per ciascun microcosmo furono monitorati 5 processi ecosistemici (respirazione, decomposizione, ritenzione dei nutrienti, produttività e ritenzione idrica). L'esperimento dimostro che la funzionalità degli ecosistemi artificiali aumentava con la diversità di organismi. Tale studio fu però criticato in quanto le specie che costituivano gli ecosistemi artificiali non erano selezionati a caso, e quindi gli ecosistemi più ricchi di specie potevano essere più funzionali solo perché contenevano le specie migliori (Wardle 1999). Gli studi successivi, volti ad investigare la relazione tra biodiversità e funzioni ecosistemiche utilizzano disegni sperimentali in cui la composizione di specie ai diversi livelli era costituita scegliendo le specie in maniera casuale, da un pool noto. In tale contesto è importante ricordare che l'assemblaggio a caso è un prerequisito cruciale per testare l'effetto della diversità (Huston 1997). Infatti, nel caso che le comunità non siano assemblate a caso non è possibile testare l'effetto della diversità *per se*, bensì si vanno a valutare i principi che erano alla base dell'assemblaggio. Numerosi studi (review in Hooper et al. 2005) hanno successivamente cercato di comprendere se l'effetto delle comunità a maggior diversità sia determinato dal *sampling effect* (i.e. la maggior probabilità che le comunità miste contengano le specie più performanti) o da una reale complementarietà tra le specie in interazione (*niche complementarity*). Alcuni dei primi esperimenti impostati su questo schema (Naeem et al. 1994; Tilman & Downing 1994; Tilman et al. 1996) affermavano l'esistenza di una chiara relazione positiva tra biodiversità e produttività.

Successivamente, alcuni studiosi (Huston 1997; Wardle 1999) criticarono anche tale approccio sostenendo che esistono dei fattori o "trattamenti nascosti" (hidden treatments) che co-variano con la diversità e che quindi ne confondono i risultati non permettendo di sostenere che la diversità è positivamente correlata con la produttività. Tilman (1999) concluse che anche il "*sampling effect*" è un vero effetto della diversità. L'autore giunse a tale conclusione grazie ad un elegante modello matematico i cui principi sono sinteticamente riportati in Figura 1.5. Il *sampling effect* infatti si basa sull'assunto che maggiore è la dimensione del pool di specie presenti, più elevata è la probabilità di avere la specie più produttiva in un determinato set di condizioni ambientali. Inoltre, in presenza di un ambiente eterogeneo, maggiore è il pool di specie con nicchia differente, più elevata è la probabilità di che sia presente la specie meglio adattata alle condizioni ecologiche presenti nel tempo o nello spazio. Al contrario, il modello della nicchia complementare si basa sull'assunto che le specie sono capaci di utilizzare diverse risorse o utilizzare la stessa risorsa in maniera differenziata e complementare in relazione alle condizioni ambientali. Le conseguenze di tale assunto è che le specie con nicchie ecologiche differenti sono capaci di utilizzare in maniera più efficiente le risorse presenti in un ambiente eterogeneo e quindi sono in grado di ottenere una maggiore produttività o altre funzioni dell'ecosistema (Fig. 1.5). Anche le interazioni positive fra specie o facilitazione (Callaway 2007), mediate da modificazioni dell'ambiente che generano condizioni favorevoli per le specie coesistenti, possono determinano una maggiore funzionalità delle comunità più ricche di specie rispetto alle monocolture (Cardinale et al. 2002). L'effetto della facilitazione di solito viene comunque incluso nel modello della complementarietà della nicchia ecologica.

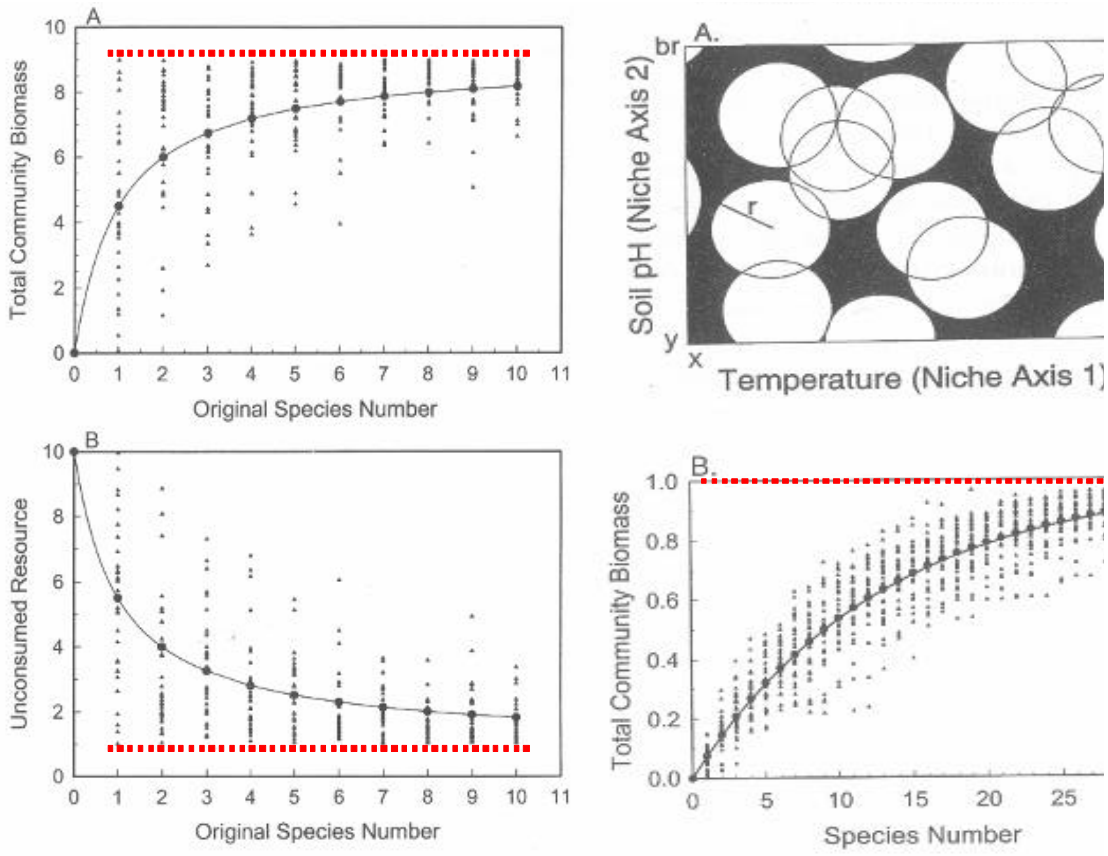

Figura 1.5. Rappresentazione schematica della relazione attesa tra diversità di specie e funzioni ecosistemiche secondo il modello del *sampling effect* (pannelli a sinistra) rispetto alla complementarietà della nicchia ecologica (pannelli a destra). Nel grafico in alto a destra i cerchi bianchi rappresentano le nicchie ecologiche di alcune specie differenziate su due potenziali assi ecologici (pH e temperatura). Se l'ambiente è temporalmente e spazialmente variabile in relazione alla temperatura e al pH del suolo e se le specie hanno nicchie differenti, allora la diversità influenza positivamente la funzionalità degli ecosistemi secondo la relazioni indicata nel pannello B a destra. Notare come in entrambi i modelli esista una relazione positiva tra diversità e funzionalità, ma solo nel caso della complementarietà della nicchia le comunità miste funzionano meglio delle migliori monocolture (linee rosse).

Un metodo semplice per testare l'importanza relativa del *sampling effect* e della complementarietà della nicchia è comparare le miglior policolture con le migliori monocolture. Se le migliori monocolture mostrano delle proprietà uguali o superiori alle migliori comunità miste, probabilmente il *sampling effect* è alla base dei risultati osservati (Fig. 1.5. Huston 1997). Al

contrario, se le migliori comunità miste mostrano delle proprietà superiori alle migliori monocolture, allora il risultato è probabilmente ascrivibile ad una complementarietà funzionale tra le specie presenti nei consorzi. In sintesi, l'effetto positivo della diversità sulle funzioni ecosistemiche può essere ricondotto a due grandi tipologie di meccanismi:

i. la *complementarietà*, un vero meccanismo biologico secondo il quale, aumentando la ricchezza di specie aumenta l'utilizzazione delle risorse e la produttività in condizioni ambientali variabili;
ii. il *sampling effect*. Tale effetto è presente quando le specie vengono scelte a caso da un pool, assunto accettabile in molti ecosistemi (Hubbell 2001). In tali condizioni, maggiore è il pool di specie, maggiore è la probabilità di includere specie altamente efficienti nelle comunità a maggior diversità.

1.4. I gruppi funzionali

Per definizione, le caratteristiche (*traits*) funzionali delle specie sono quelle che potenzialmente influenzano le proprietà degli ecosistemi o le risposte delle specie alle condizioni ambientali. Le specie sono spesso raggruppate insieme secondo la loro funzionalità per comprendere i meccanismi generali o per semplificare lo studio di sistemi molto complessi. I tipi funzionali, anche conosciuti come *gruppi funzionali* sono un concetto relativamente semplice. Un gruppo funzionale è un insieme di specie che hanno un effetto simile o su uno specifico processo ecosistemico o sulle condizioni ambientali. Nonostante sia utile costituire dei gruppi funzionali, nella pratica non è facile definirli né tantomeno quantificare la diversità funzionale per i seguenti motivi:

1. l'effetto degli organismi sulle proprietà dell'ecosistema normalmente si distribuiscono su un gradiente continuo, non in gruppi distinti.

Quindi, stabilire dei *gruppi* funzionali potrebbe richiedere delle decisioni arbitrarie per fissare i limiti tra un gruppo e l'altro.

2. le caratteristiche che influiscono su come una specie reagisce ad un disturbo o ad un modificazione ambientale (*functional response*) potrebbero essere diverse da quelle che regolano l'effetto di tali specie sulle proprietà dell'ecosistema (*effects traits*). Capire il legame tra *functional response* e *effects traits* è una sfida molto importante, ma è difficile comprendere le dinamiche di un ecosistema in un mondo in continua evoluzione (Lavorel & Garnier 2001).
3. i gruppi funzionali identificati per alcune proprietà di un ecosistema potrebbero non essere necessariamente rilevanti per altre proprietà. Costituire dei gruppi considerando alcune caratteristiche note per la loro influenza sulle funzioni (peso dei semi, superficie fogliare, altezza della pianta) potrebbe essere utile per superare questo limite. Tuttavia, rimane ancora da scoprire se tale approccio possa essere vantaggioso anche nello studio della relazione tra biodiversità e funzioni ecosistemiche (Grime 2001).
4. la diversità funzionale è correlata con la diversità di specie negli ecosistemi naturali? La risposta a questa domanda in parte risiede nei meccanismi di assemblaggio delle comunità (Fridley 2001; Hooper et al. 2005). Secondo la teoria della differenziazione delle nicchie, le caratteristiche funzionali di organismi che coesistono nello stesso ecosistema devono differire a qualche livello, quindi all'aumentare della ricchezza di specie dovrebbe aumentare anche la diversità funzionale. E' anche vero che dei "filtri" ambientali molto forti potrebbero limitare la composizione di specie in uno spettro funzionale molto ristretto (Lavorel & Garnier 2001), limitando quindi il grado di diversità funzionale capaci di influenzare differenti proprietà dell'ecosistema.

Possiamo quindi affermare che i gruppi funzionali sono raggruppamenti di specie che condividono caratteristiche morfologiche e fisiologiche o altri tratti rilevanti nel controllo di un processo ecosistemico. Nonostante i gruppi funzionali non siano sempre ben definiti, essi aiutano a chiarire i meccanismi attraverso i quali le specie influenzano i processi e a semplificare gli studi in sistemi con una grande diversità di specie.

1.5. La diversità microbica del suolo

L'equilibrio di un ecosistema è mantenuto nel tempo dalle relazioni tra tutti gli esseri viventi che lo abitano attraverso il continuo scambio di materia e di energia. Tutti i fattori ambientali di natura chimico-fisica che caratterizzano un ecosistema, quali la temperatura, il pH, la concentrazione di sali minerali, la quantità di luce, l'ossigeno e l'anidride carbonica disponibili costituiscono le componenti abiotiche. In questa parte inanimata detta "biotopo" alberga la comunità vivente costituita dall'insieme delle componenti biotiche; esse sono formate da specie vegetali, animali e microrganismi e sono dette nel loro insieme "biocenosi". La biocenosi terrestre è composta da 10-100 milioni di specie tra piante, animali e microbi (Pimm et al. 1995). In tale contesto, il suolo è una delle maggiori riserve di diversità biologica del nostro pianeta. Molti processi e interazioni si svolgono nel suolo, contribuendo ad un numero considerevole di funzioni. Tra tutti i servizi ecologici, sociali ed economici identificati, il ruolo del suolo come riserva di biodiversità è stata stabilita insieme al suo ruolo nella purificazione delle acque di superficie, nel riciclo di elementi minerali e nel mantenimento del ciclo del carbonio, in particolare come *sink* per la CO_2 atmosferica (Post et al. 2004). Un metro quadrato di suolo normalmente ospita una popolazione di circa 200,000 artropodi e miliardi di microbi. Un ettaro di suolo di alta qualità contiene in media 1,300 kg di vermi, 1,000 kg di artropodi, 3,000 kg di batteri, 4,000 kg di funghi ed

un'elevata biomassa e necromassa vegetale (Pimentel et al. 1995). Sulla base di studi basati su tecniche tradizionali di coltivazione, gli organismi procariotici che normalmente si ritrovano nel suolo sono batteri gram-positivi (es. *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.) o a differenti sottogruppi dei proteobatteri (es. *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Rhizobium* spp.) o il gruppo dei Cytophaga/Flavobacteria/*Bacteroides* (CFB). Il genere *Pseudomonas* è facile da isolare tramite coltivazione ed è uno degli organismi tellurici più studiati (Garbeva et al. 2004). Altri generi comunemente isolati da suolo sono *Acinetobacter*, *Agrobacterium* (*α*-Proteobacteria), *Alcaligenes* (*β*-Proteobacteria), e *Xanthomonas* (*γ* -Proteobacteria). Gli stessi generi sono stati ritrovati tramite metodi molecolari diretti, in particolare l'analisi delle librerie 16S rDNA. Come i batteri, solo frazioni ridotte dei funghi presenti nel suolo sono facilmente colturabili su substrati artificiali. Alcuni taxa fungini, come i basidiomiceti saprofiti e le micorrize arbuscolari appartenenti all'ordine dei *Glomales* sono difficili da isolare dal suolo. In diversi studi per indagare la diversità fungina nel suolo sono state adottate tecniche molecolari basate sul gene 18S rRNA (Gomes et al. 2003). Non sempre l'rDNA 18S amplificato è sufficiente per identificare le specie fungine, perché il database non è ancora completo. Comunque, Gomes e collaboratori, utilizzando le librerie 18S rDna, sono riusciti ad identificare funghi diversi *Ascomycota* (*Pleosporales*, *Hypocreales*, *Sordariales* ed *Eurotiales*), *Basidiomycota* (*Filobasidiales*, *Sporidiales*) e *Zygomycota* (*Mucorales*).

1.5.1. Relazione tra biodiversità microbica e funzionalità dell'agro ecosistema

E' noto che i microrganismi influenzano numerosi processi ecosistemici, in particolar modo la decomposizione della sostanza organica e i cicli dei nutrienti, regolando quindi la produttività delle piante, le dinamiche della comunità e la formazione della struttura del suolo (Tabella 1.2). Un gran numero di microbi tellurici formano strette associazioni con le piante e riescono a stimolare la loro produttività cedendo alle piante i nutrienti in forma minerale. In particolare un'elevata diversità tassonomica e di gruppi funzionali microbici coesistono nell'ambiente rizosferico (Fig. 1.6). La rizosfera è il volume di suolo che circonda le radici, e nel quale lo sviluppo dei microrganismi è stimolato rispetto al suolo circostante. L'esistenza della rizosfera è determinata dall'emissione da parte dell'apparato radicale (rizodeposizione) di sostanze organiche di varia natura quali carboidrati, aminoacidi, acidi organici ecc., che sono l'elemento chiave per il mantenimento di una comunità microbica attiva e funzionale che circonda le radici stesse (Lynch & Whipps 1990; Jones et al. 2004). I differenti microrganismi che coesistono nella rizosfera come funghi micorrizici e non, batteri, nematodi e protozoi svolgono funzioni specifiche e differenti ma coordinate nel loro complesso, a supportare la crescita e lo sviluppo delle piante (Bais et al. 2006; Buée et al. 2009a). Tali associazioni simbiotiche, in quanto positive per tutti i membri in interazione, è solo in prima analisi costosa per la pianta che rilascia nel suolo fino al 20% delle energie fissate attraverso la fotosintesi. In realtà tale costo è più che controbilanciato dai vantaggi che ottiene, in quanto la propria crescita è supportata dai microrganismi benefici rizosferici. Tali microrganismi infatti, provvedono a svolgere con elevata efficienza numerose funzioni, le più importanti delle quali sono: (i) l'assorbimento degli elementi nutritivi e dell'acqua e contemporaneamente agire da filtro verso gli inquinanti del suolo; (ii) la

protezione delle radici e le foglie dagli organismi patogeni (Harman et al. 2004).

Le associazioni simbiotiche tra piante e batteri azoto-fissatori che convertono l'N atmosferico in N ammoniacale sono forse i meglio studiati (Perret et al. 2000; Sprent 2001). I batteri azoto-fissatori sono importanti regolatori della produttività della piante perché le piante non riescono a fissare l'N atmosferico e perché l'azoto è, insieme al fosforo e al potassio, il principale elemento che limita la produttività della piante (Walker 1993).

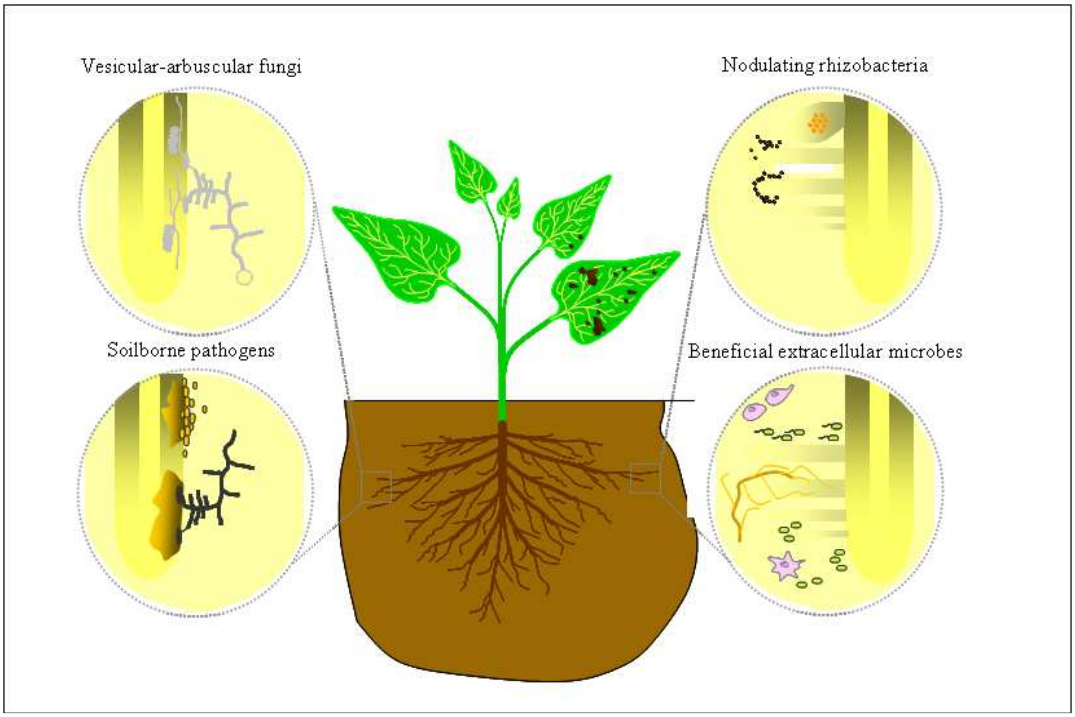

Figura 1.6. Rappresentazione schematica dei principali gruppi funzionali microbici che coesistono nella rizosfera di specie erbacee (modificato da Bonanomi et al. 2009).

Un altro importante gruppo di simbionti che migliorano la produttività delle piante apportando elementi limitanti, sono i funghi micorrizici (Smith & Read 1997). I funghi micorrizici sono molto diffusi e formano associazioni simbiotiche con le radici di circa l'80% delle specie vegetali terrestri. I funghi micorrizici possono indurre resistenza alle malattie verso i patogeni,

ridurre l'impatto della siccità e fornire un gran numero di elementi nutritivi come N, P, Cu, Fe e Zn alla pianta in cambio di carbonio organico necessario per la loro crescita. I più abbondanti e importanti gruppi di funghi micorrizici sono le micorrize arbuscolari (AM), le ecto-micorrize (EM) e le micorrize ericoidi (ERM). Questi funghi simbiotici micorrizici instaurano una stretta associazione con le piante e rendono possibile, grazie alla loro capacità di formare una sottile ed estesa rete di ife nel suolo, un assorbimento efficiente degli elementi nutritivi e dell'acqua necessari alla pianta. Conseguentemente, le piante micorrizate richiedendo un minor apporto di fertilizzanti, permettono una migliore gestione con minori pericoli di inquinamento delle acque, come nel caso dei nitrati e fosfati.

Processo ecosistemico	**Microrganismi coinvolti**	**Contributo al processo (%)**
Ciclo del Carbonio		
Produttività delle piante	Batteri azoto-fissatori, funghi micorrizici	0-50%
	Microbi patogeni	-50-0%
Decomposizione della sostanza organica	Batteri, funghi	Fino al 100%
Ciclo dell'Azoto		
Acquisizione dell'Azoto		
Fissazione dell'Azoto	Rizobi, Attinomiceti, Batteri azoto fissatori liberi	0-20%
Asportazione dal suolo	Funghi micorrizici	0-80%
Perdita di Azoto		
Denitrificazione	Batteri denitrificanti, alcuni funghi	Fino al 60%
Lisciviazione intensificata dalla nitrificazione	Batteri nitrificanti	?
Ciclo del Fosforo		
Acquisizione del Fosforo	Funghi micorrizici e batteri solubilizza tori del P	0-90%

Tabella 1.2. Influenza dei microbi tellurici su alcuni processi ecosistemici del suolo (modificato da van der Heijden et al. 2008).

Altra funzione fondamentale della microflora rizosferica è la protezione dai patogeni tellurici (Cook et al. 1995; Weller et al. 2002). I patogeni tellurici sono riconosciuti come uno dei principali fattori limitanti la produttività negli agro-ecosistemi, ed inoltre sono difficili da controllare anche con le strategie di lotta convenzionali ad elevato impatto ambientale. In quest'ottica, numerosi organismi rizosferici comprendenti funghi come *Trichoderma* e batteri appartenenti ai generi *Bacillus* e *Pseudomonas* ed gli attinomiceti sono potenzialmente capaci di controllare i patogeni tellurici. I meccanismi determinanti tale attività sono molteplici e complessi, fra questi la competizione per lo spazio ed i nutrienti, l'antibiosi, la predazione e non ultima l'induzione di resistenza nelle piante.

Dal punto di vista dell'approccio di studio delle comunità microbico esistono due grandi alternative. Nel primo caso, le singole specie vengono studiate per gli aspetti tassonomici, di biologica molecolare, fisiologia ed ecologia. Nel secondo le comunità microbiche telluriche sono spesso considerate come una "scatola nera" funzionale (Andren & Balandreau 1999) che genera flussi di materia, energia e informazioni, l'intensità dei quali è strettamente dipendente da fattori abiotici come la temperatura, l'umidità e il pH. Quest'approccio quindi esclude l'analisi della struttura delle comunità microbiche e le interazioni trofiche, considerando invece l'attività microbica e le conseguenze funzionali che ne risultano. Tale approccio è determinato dalla grande complessità funzionale e tassonomica delle comunità microbica che ne determina la difficoltà di manipolazione sperimentale. In alcuni casi le attività microbiche e biochimiche sono utilizzate come potenziali indicatori della qualità del suolo, anche se quest'ultima in realtà dipende da un insieme di caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche (Kennedy & Papendick, 1995). Per *attività microbica* si intendono le numerose attività condotte dai microrganismi nel suolo,

mentre l' *attività biologica* include, oltre all'attività microbica, anche le funzioni svolte nel suolo da altri organismi, comprese le radici delle piante (Nannipieri et al. 2003).

Il legame tra diversità microbica e funzionalità del suolo è ancora poco conosciuto perché è molto difficile misurare la diversità microbica del suolo. Inoltre, generalmente le funzioni del suolo vengono misurate tramite la determinazione dei processi microbici, senza conoscere le specie microbiche effettivamente coinvolte nei processi misurati. Secondo O' Donnell et al. (2001), il problema di fondo del rapporto tra diversità microbica e funzioni del suolo è capire la relazione tra diversità genetica e struttura della comunità e tra struttura della comunità e funzionalità. Questi rapporti tra diversità microbica e funzioni del suolo finora sono stati studiati da approcci basati sull'utilizzo di:

- suoli con la stessa tessitura ma diversa composizione microbica;
- trattamenti ripetuti con fumiganti per ridurre la diversità microbica;
- biocidi specifici per determinati l'effetto di specifici gruppi di microrganismi;
- suoli sterili inoculati con microrganismi tellurici.

Il secondo e il terzo approccio sono di tipo distruttivo, mentre il quarto è di tipo costruttivo (Griffiths et al. 2000).

1.5.2. Fattori ecologici che influenzano la diversità microbica del suolo

Nel suolo un gran numero di fattori influenzano la vita microbica, ma ancora rimane da chiarire quali di essi abbiano un ruolo principale nel controllo della struttura e diversità delle comunità microbiche. A tale proposito, esistono tre principali ipotesi:

1. ***Effetto dei vegetali***. La copertura vegetale, essendo le piante i principali produttori di specifiche fonti di carbonio ed energia per i microrganismi, influenzano la struttura e diversità delle comunità

telluriche. Le radici delle piante rilasciano nel suolo un gran quantità di sostanze nel suolo circostante come zuccheri, amminoacidi, acidi organici, vitamine, polisaccaridi ed enzimi. Questi materiali creano un ambiente unico per i microrganismi che vivono in associazione con le radici, nella rizosfera. I microrganismi rispondono in maniera diversa ai composti rilasciati dalle radici e composizioni differenti di essudati radicali selezionano diverse comunità microbiche nella rizosfera. A loro volta, i batteri della rizosfera possono promuovere lo sviluppo delle piante per mezzo di segnali chimici come le auxine, le giberelline, i glicolipidi e le citochinine. I generi *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Phyllobacterium*, e *Azospirillum* sono alcuni dei PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) più efficienti (Bertrand et al. 2001; Gray & Smith 2005). Il tipo di pianta è sicuramente uno dei fattori principali che regolano la struttura delle comunità microbiche che in casi specifici è anche influenzata dal genotipo della pianta, dalla zona radicale o dall'età della pianta.

2. ***Effetto del tipo di suolo.*** Il tipo di suolo rappresenta un altro importante fattore determinante la diversità microbica. Il suolo, infatti, sulla base della diversa tessitura, del pH, della capacità di scambio cationico e il contenuto di sostanza organica, può influenzare la struttura della comunità microbica direttamente (fornendo un habitat specifico che seleziona determinati microrganismi) o indirettamente (regolando il funzionamento delle radici e l'essudazione). Anche la struttura, la stabilità dei microaggregati, la presenza di nutrienti chiave come N, P e Fe determinano la formazione di nicchie abitabili nel suolo. E' stato studiato anche l'effetto del suolo e del tipo di seme sulla struttura della comunità intorno al seme in germinazione (Nelson 2004).

3. ***Gestione del suolo.*** Recenti studi hanno provato che la gestione del suolo, come le rotazioni, le lavorazioni, l'applicazione di erbicidi e fertilizzanti, l'utilizzo di compost e l'irrigazione influenzano notevolmente i parametri microbici (Schonfeld et al. 2002; Bonanomi et al. 2011). Gli effetti dei trattamenti sono complessi e le conseguenze sulla microflora spesso non sono facilmente spiegabili. In alcune indagini è stato provato che il contenuto in PLFA è direttamente correlato al tipo di regime di gestione (Bossio et al 1998). In altri studi è stato mostrato che l'apporto di sostanza organica può stimolare positivamente la biomassa microbica del suolo, con effetti positivi sulla fertilità, sulla salute delle piante e sulla soppressività dei suoli (Bonanomi et al. 2010b).

1.5.3. Metodi e tecniche per lo studio della diversità microbica tellurica

Diversità microbica è un termine generico che può riferirsi a:

- la diversità genetica, cioè la quantità e la distribuzione di informazioni genetiche all'interno delle specie microbiche;
- la diversità tassonomica di funghi e batteri nelle comunità microbiche;
- la diversità ecologica, cioè la variazione della struttura delle comunità, complessità di interazioni, numero di livelli trofici, e numero di associazioni.

Per ora consideriamo la diversità microbica semplicemente come numero di differenti specie fungine e batteriche (ricchezza di specie o *species richness*) e la loro relativa abbondanza (*evenness*) nella microflora tellurica. La diversità microbica può essere misurata con diverse tecniche come la conta tradizionale in piastra e le conte dirette, come le nuove tecniche molecolari e l'analisi degli acidi grassi. Nessuna di queste tecniche è in grado di fornire, da sola, una valutazione completa della diversità microbica

del suolo, quindi per ottenere una stima più approfondita sarebbe necessario combinare insieme diverse tecniche che si completino a vicenda (Liesack et al. 1997; Zhang et al. 2008). Inoltre, importanti prospettive sono rivolte alla possibilità di combinare i dati tassonomici con indicatori ampiamente utilizzati in ecologia microbica come l'attività e la biomassa microbica, oltre ad indici quali il quoziente microbico ed il coefficiente di mineralizzazione endogena (Widmer et al. 2001).

1.5.3.1. Conte dirette su substrati selettivi e metodi biochimici

I metodi per valutare la diversità dei microrganismi del suolo, sia a livello di specie che di comunità, sono numerosi. Le tecniche tradizionali per analizzare i microrganismi del suolo sono basate sulla coltivazione e l'isolamento su substrati selettivi e semi selettivi (van Elsas et al. 1998). Di conseguenza, sono stati realizzati numerosi mezzi di coltura specifici per poter isolare diversi gruppi microbici. Purtroppo, i metodi colturali pur essendo molto semplici ed economici non permettono di studiare la microflora edafica in maniera esaustiva. Infatti, con i comuni terreni di coltura e alle condizioni riproducibili in laboratorio è possibile isolare solo lo 0,1-5% dei batteri viventi nel suolo (Zhang et al. 2008). Tra gli approcci biochimici, il metodo BIOLOG EcoPlates™ permette, senza dover misurare ed identificare le singole specie, una valutazione diretta l'attività e della diversità funzionale delle comunità microbiche tramite lo sviluppo di profili fisiologici a livello di comunità (Bartelt-Ryser et al. 2005).

1.5.3.2. Approcci molecolari

Generalmente, le tecniche molecolari per l'analisi della diversità microbica tellurica richiedono l'estrazione, diretta o indiretta, degli acidi nucleici dal suolo (Fig. 1.7). Sono cultura-indipendente e, in base alla loro sensibilità, riescono ad identificare generi, specie, famiglie o anche gruppi tassonomici.

I metodi a “bassa risoluzione” includono l’analisi della distribuzione delle basi azotate del DNA (% di guanina + citosina) e la determinazione della percentuale a cui un filamento a singola elica di DNA si riassocia quando la temperatura è abbassata a 25°C al di sotto della Temperatura di melting (Torsvik et al. 1996). Queste tecniche danno un’indicazione globale della diversità microbica e può essere utilizzata cambiamenti complessivi nella composizione di una comunità microbica dopo uno stress o una differente gestione del suolo (Nannipieri et al. 2003). Le analisi molecolari ad “alta definizione” permettono il riconoscimento di ceppi microbici a livello di specie e subspecie. Generalmente, esse forniscono il fingerprint di regioni di DNA non codificanti, oppure prevedono il sequenziamento sia di regioni codificanti che non codificanti.

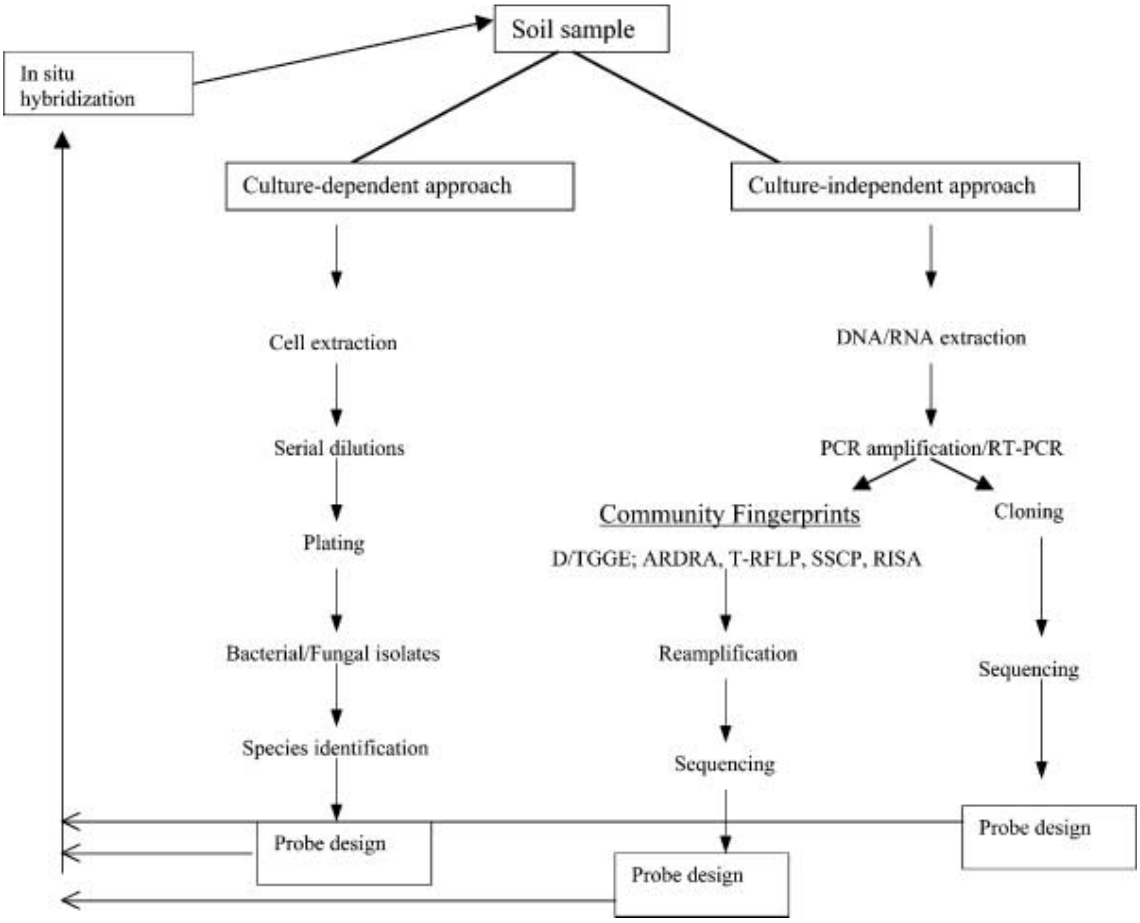

Figura 1.2. Rappresentazione schematica degli approcci coltura dipendente e coltura indipendente per lo studio della diversità microbica nel suolo e nella rizosfera (modificato da Garbeva et al. 2004).

Queste tecniche richiedono la PCR di sequenze ripetute, l'analisi di sequenze intergeniche ribosomiali (RISA), basata sul polimorfismo della lunghezza della regione tra i geni 16S e 23S rRNA e il DNA polimorfico amplificato a caso (RAPD) che non richiede una conoscenza preliminare del genoma. La maggior parte dei metodi molecolari forniscono un risultato di qualità intermedia, perché permettono la determinazione di gruppi, piuttosto che di specie microbiche. Di solito, queste tecniche forniscono dei profili di campioni multipli utilizzati per studiare le variazioni spazio-temporali nella composizione della microflora del suolo (Muyzer & Smalla 1998). Tra le tecniche a "risoluzione intermedia", la DGGE (Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante) e la TGGE (Elettroforesi su Gel in Gradiente Termico) sono le più utilizzate per la caratterizzazione delle comunità

batteriche nell'ambiente. Sono relativamente semplici e veloci e basate sulla mobilità elettroforetica dei frammenti di DNA (ottenuti tramite PCR) in gel di poliacrilammide all'interno di un gradiente lineare denaturante, dovuto a sostanze chimiche (DGGE) o alla temperatura (TGGE). La velocità dei frammenti di DNA lungo il gradiente dipende dalla composizione del DNA (Heuer et al. 2001). Queste tecniche permettono di distinguere molecole che differiscono anche per una singola base e l'identità delle bande può essere indagata tramite ibridazione con sonde specifiche oppure tramite estrazione e sequenziamento (Muyzer & Smalla 1998). Le tecniche basate sulla PCR presentano però anche degli svantaggi e limiti tecnici. La lisi incompleta delle cellule di alcune specie batteriche gram-positive possono compromettere o rendere non rappresentativa la PCR. L'amplificazione può essere inibita anche se, col processo di purificazione, non vengono rimossi i contaminanti. Infatti, gli acidi umici o le sostanze umiche coestratte con gli acidi nucleici inibiscono fortemente gli enzimi che modificano il DNA (es. Taq-polimerasi) anche a concentrazioni minime (Wintzingerode et al. 1997). L'efficienza della PCR può essere invalidata anche la presenza di una particolare sequenza o banda in differenti organismi oppure da bande eterogenee che si originano da un solo organismo dovuta all'eterogeneità nei geni rDNA.

Un altro metodo utilizzato per determinare la composizione della biomassa microbica del suolo, superando i limiti delle conte dirette, è l'analisi degli acidi grassi del fosfolipidi (PFLA). Questa tecnica è basata sull'estrazione, frazionamento, metilazione e cromatografia della componente fosfolipidica dei lipidi del suolo. Si pensa che i fosfolipidi siano legati dalla componente vitale della microflora tellurica, perché sono presenti in membrane di cellule viventi e si degradano velocemente quando la cellula muore e non possono resistere abbastanza a lungo per reagire con i colloidi del suolo (Zelles, 1999). L'estrazione diretta dei PLFA dal suolo

non permette la determinazione a livello di specie e può essere sfruttata solo per studiare grandi cambiamenti nella struttura della comunità.

Recentemente sono state sviluppate tecniche basate sul completo sequenziamento degli acidi nucleici estratti dal suolo e successiva analisi bioinformatica dei dati (es. pirosequenziamento 454; Buée et al. 2009b; Jones et al. 2009). Le potenzialità di questi approcci sono notevoli in quanto permettono l'ottenimento di dataset metagenomici delle comunità naturali. Al contempo però, tali tecniche risultano ancor molto costose.

La misurazione della biodiversità microbica tellurica risulta quindi difficile per diversi motivi. I problemi nel campionamento e nell'estrazione dal suolo sono comuni a molti gruppi microbici. Oltre alle difficoltà tassonomiche e metodologiche, alcuni studi hanno suggeriscono che l'uso della diversità come indice della funzionalità dell'ecosistema potrebbe non essere appropriato per le comunità microbiche naturali. Per esempio, Tate (1997) si chiedeva se fosse utile distinguere gli ecosistemi in quelli a diversità "più alta" e "più bassa". Infatti, considerando l'enorme ricchezza di specie (anche per le comunità a diversità "bassa") e il fatto che esse possano contenere numerose popolazioni dormienti anche le comunità naturali più povere di specie dovrebbero essere perfettamente funzionali. Inoltre, la versatilità fisiologica di molti microrganismi presenta un'altra difficoltà nel determinare la relazione tra struttura della comunità microbica e funzioni. Molti studi hanno dimostrato che su larga scala l'abilità funzionale di una comunità microbica spesso non è controllata dalla diversità degli organismi (Fernandez et al. 1999) ed è stato suggerito che la ridondanza delle funzioni potrebbe essere molto più importante per comprendere la stabilità delle comunità microbiche e delle funzioni ecosistemiche che esse svolgono, piuttosto che le misure tradizionali della diversità (Briones & Raskin 2003). Nonostante sia un importante parametro

della funzionalità di un ecosistema, la ridondanza funzionale delle comunità microbiche è stata oggetto di pochi studi (Setälä & McLean 2004).

1.5.3.3. Tecniche per manipolare sperimentalmente la diversità microbica

I consorzi microbici sono ubiquitari in natura e sono coinvolti in processi di grande importanza per gli uomini, dal bio-risanamento ambientale alla digestione alimentare (Brenner et al. 2008). Le popolazioni microbiche miste riescono a svolgere funzioni che risulterebbero difficili o addirittura impossibili per ceppi o specie individuali. Riuscire a bilanciare obiettivi differenti nell'ambito di un solo organismo può rappresentare, in alcuni casi, una sfida impossibile. Per esempio, è difficile ingegnerizzare un pathway efficiente, metabolicamente indipendente in una sola cellula, permettendole di consumare zuccheri a cinque e sei atomi di carbonio e allo stesso tempo i prodotti dalla degradazione della lignina. Ad esempio l'asincronia nella degradazione, dovuta alla preferenza per il glucosio, riduce l'efficienza di tali sistemi. Al contrario, le funzioni difficili da effettuare per una sola specie potrebbero essere separate in popolazioni ottimizzate individualmente. Per esempio, ceppi di *Escherichia coli* sono stati ingegnerizzati in maniera che uno metabolizzasse solo glucosio e l'altro solo xylosio e regolati in modo che consumino i propri substrati alla stessa velocità. Quando sono coltivati in co-coltura i due ceppi fermentano gli zuccheri in maniera più efficiente di quanto farebbe ogni singola coltura svolgendo contemporaneamente le due funzioni (Eiteman et al. 2008). Un'altra qualità importante dei consorzi biologici rispetto ai singoli individui è la maggiore resistenza alle fluttuazioni ambientali (Brenner et al. 2008). Queste proprietà dei consorzi risiedono in due caratteristiche organizzative:

1) i membri di un consorzio comunicano fra loro. Sia attraverso lo scambio di metaboliti e di specifiche molecole segnale, ogni singola popolazione o individuo avverte e risponde alla presenza di altri individui all'interno del consorzio;
2) la divisione del lavoro. L'attività complessiva del consorzio risulta dalla combinazione di funzioni svolte dai singoli individui o "sub-popolazioni".

Abbiamo già visto come, data la sua enorme complessità, è difficile valutare e gestire la struttura delle comunità microbiche del suolo. L'indagine sperimentale del rapporto tra diversità microbica tellurica e funzioni ecosistemiche richiede forzatamente lo sviluppo di sistemi sperimentali semplificati, ma al tempo stesso realistici. Al fine di meglio comprendere la funzionalità dei consorzi microbici è possibile manipolarne i livelli di diversità e successivamente valutarne la funzionalità. In tale contesto esistono due approcci tra loro complementari:

(i) ***Comunità sintetiche***. Utilizzo di comunità assemblate in laboratorio o "sintetiche". In questo approccio le comunità microbiche "sintetiche" sono assemblate selezionando a random le specie partendo da un pool microbico noto (Tilman 1999). Questo approccio permette di valutare l'effetto della diversità microbica (trattata come fattore sperimentale) sulla suscettibilità dei microcosmi ad essere invasi da specie non-residenti, a decomporre sostanze organiche, a produrre carbonio organico ecc. L'assemblaggio a random è un prerequisito fondamentale per testare effettivamente il ruolo della diversità microbica ed escludere altri fattori che possono covariare con la diversità (Huston 1997). I livelli di diversità solitamente sono modulati assemblando comunità microbiche con diversità progressivamente crescente (il numero di specie

comunemente varia da 1, 2, 4, fino a oltre 70 specie contemporaneamente, Bell et al. 2005);

(ii) ***Diluizioni-estinzioni.*** Questo secondo approccio è complementare al primo. Infatti, la maggior parte degli studi presenti in letteratura volti a definire le relazioni tra biodiversità e funzioni ecosistemiche, utilizzano solo una limitata frazione della diversità microbica esistente per allestire comunità sintetiche con differente diversità. Un passo per superare i limiti del primo approccio (es. le specie non colturabili non possono ovviamente essere incluse) si basa sull'utilizzo dell'estinzione selettiva delle specie e/o di gruppi funzionali (Weller et al. 2002; Griffiths et al. 2000; Hannes et al. 2010). Tale approccio permette un'analisi più realistica del possibile impatto della riduzione delle diversità sulla funzionalità delle comunità microbiche naturali. In questo caso le comunità microbiche selezionate saranno trattate con il metodo delle diluizioni-estinzioni per generale gradienti di ricchezza specifica. Questo permette di includere non solo le specie colturabili (comunemente l'1-5% delle specie presenti) ma anche quelle non colturabili (van der Heijden et al. 2008). Il limite di questo approccio è che non permette di generare gradienti di diversità in cui il numero di specie nelle comunità è sotto controllo sperimentale.

1.6. Obiettivi della tesi

Lo studio riportato in questa tesi di Dottorato ha avuto come obiettivo generale indagare le relazioni che esistono fra diversità microbica, in presenza di fattori di ambientali variabili, e alcune funzioni ecosistemiche fondamentali negli agroecosistemi. In particolare sono state indagate le relazioni tra diversità microbica e:

(1) la capacità delle comunità microbiche di decomporre la sostanza organica e quindi effettuare il ciclo del carbonio (Capitolo 2);

(2) la capacità delle comunità microbiche di indurre fungistasi nei suoli e quindi controllare le malattie delle piante (Capitolo 3);

(3) la capacità delle comunità microbiche di resistere all'invasione da parte di specie aliene all'ecosistema. In dettaglio è stata studiata la capacità di comunità microbiche con differente diversità di resistere all'invasione di una specie batterica (Capitolo 4).

Per rispondere a queste domande è stato deciso di utilizzare l'approccio delle comunità sintetiche, applicato alle tre funzioni sopra elencate. Attraverso tale metodo sono state allestite comunità con elevati livelli di complessità (ricchezza di specie variabile da 1 fino a 64 specie presenti contemporaneamente) la cui funzionalità è stata comparata rispetto a comunità microbiche semplificate.

1.7. Referenze citate

Andren, O., Balandreau J., 1999. Soil functioning –from black box to can of worms? *Applied Soil Ecology* 13: 105-108.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organ-isms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.

Bardgett, R.D., Shine, A., 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 317-321.

Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balser, T., 2005. Soil feedbacks of plant-diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspective in Plant Ecology & Systematics* 7: 27-49.

Bell, T. Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L,, Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436: 1157-1160.

Bertrand, H., **Nalin, R., Balli, R., Cleyet-Marel, J.C., 2001.** Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica mapus*). *Biology and Fertility of Soils* 33: 152-56.

Bonanomi, G., Vinale, F., Scala, F. 2009. The role of natural products on plant-microbe interactions. In: Lanzotti, V., & Osbourn, A. Eds. Springer, London.

Bonanomi, G., Incerti, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Mazzoleni, S., 2010a. Decomposition and nutrient dynamics in mixed litter of Mediterranean species. *Plant and Soil* 331: 481-496

Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010b. Identifying the characteristics of organic soil amendments that

suppress soilborne plant diseases *Soil Biology & Biochemistry* 42: 136-144.

Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A., 2011a. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Applied Soil Ecology* 47:184-194.

Bossio, D.A., Scow, K.M., Gunpala, N., Graham, K.J., 1998. Determination of soil microbial communities: effect of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbiological Ecology* 36: 1-12.

Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008 Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in biotechnology* 9: 483-489.

Briones, A., **Raskin, L., 2003** Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 270–276.

Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E., 2009a. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321: 189-212.

Buée, M., Reich1, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F., 2009b. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184: 449-456.

Callaway, R.M., 2007. Positive interactions and interdependence in plant communities. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Cardinale, B.J., Nelson, K., Palmer, M.A., 2000 Linking species diversity to the functioning of ecosystems: on the importance of environmental context. *Oikos* 91: 175-183.

Cardinale, B.J., Palmer, M.A., Collins, S.A., 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* 15: 426-429.

Chapman, K., Whittaker, J.B., Heal, O.W., 1988 Metabolic and faunal activity in litters of tree mixtures compared with pure stands. *Agriculture Ecosystems & Environment* 24: 33-40.

Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 92: 4197-4201.

Dang, C.K., Chauvet, E., Gessner, M.O., 2005. Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships. *Ecology Letters* 8: 1129-1137.

Darwin, C., 1862. The Voyage of the Beagle. Garden City, NJ: Doubleday.

de Groot, R.S., Wilson, M.A., Boumans, R.M.J., 2002. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological Economics* 41: 393-408.

Deacon, L.J., Pryce-Miller, E.J., Frankland, J.C., Bainbridg, B.W., Moore, P.D., Robinson, C.H., 2006. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 7-20.

Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Duncan, L.C., 2001 Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less

resistant to stress or disturbance? *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1143-1153.

Eiteman, M.A., Lee, S.A. Altman, E., 2008 A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *Journal of Biological Engineering* 2, 3.

Falkowski, P.G., **Fenkel T., Delong E.F., 2008** The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* 320: 1034-1039.

Fernandez, A., Huang, S.Y., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J., 1999 How stable is stable? Function versus community composition. *Applied Environmental Microbiol*ogy 65: 3697-3704.

Fridley, J.D., 2001 The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where and why? *Oikos* 93: 514-526.

Garbeva, P., **van Veen J.A., van Elsas J.D., 2004.** Assessment of the diversity, and antagonism toward *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiological Ecology* 47: 51-64.

Gartner, T.B., Cardon Z.G., 2004. Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter *Oikos* 104:230-246.

Gomes, N.C.M., **Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N.G., Buchner, A., 2003.** Dynamics of fungal communities in bulk soil and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied Environmental Microbiology* 69: 3758-66.

Gray, E.J., Smith, D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: common-alities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 395-412.

Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sorensen, S.J., Bååth, E., Bloem, J., de Ruiter, P.C., Dolfing, J., Nicolardot, B., 2000 Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an

examination of the biodiversity-ecosystem functioning relationship. *Oikos* 90: 279-294.

Grime, J.P., 2001. Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties. *John Wiley and Sons, Chichester, UK.*

Hannes, P., et al., 2010. Function-specific response to depletion of microbial diversity. *The ISME Journal* 5:doi:10.1038/ismej.2010.119.

Harman, E., Howell, R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* 2: 43-56.

Hättenschwiler, S., Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review Ecology Evolution & Systematic* 36: 191-218.

Hector, A., **Beale, A., Minns, A., Otway, S., Lawton, J.H., 2000.** Consequences of loss of plant diversity for litter decomposition: mechanisms of litter quality and microenvironment. *Oikos* 90: 357-371.

Hector, A., **Dobson, K., Minns, A., Bazeley-White, E., Lawton, J.H., 2001.** Community diversity and invasion resistance: an experimental test in a grassland ecosystem and a review of comparable studies. *Ecological Research* 16: 819-831.

Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M. C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P. G., Finn, J. A., Freitas, H., Giller, P. S., Good, J., Harris, R., Hogberg, P., Huss-Danell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Korner, C., Leadley, P. W., Loreau, M., Minns, A., Mulder, C. P. H., OÕDonovan, G., Otway, S. J., Pereira, 1 J. S., Prinz, A., Read, D. J., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.-D., Siamantziouras, A.-S. D., Spehn, E. M., Terry, A. C., Troumbis, A.Y., Woodward, F. I., Yachi, S., Lawton, J.H., 1999. Plant

diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* 286: 1123-1127.

Heuer, H., **Wieland, G., Schonfeld, J., Schnwalder, A., Gomes, N.C.M., Smalla, K., 2001.** Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications (ed. P.A. Rochelle), pp. 177–190. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

Hooper, D.U., **Chapin, III F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setala, H.,Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005** Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensun of current knowledge. *Ecological Monograph* 75: 3-35.

Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* 277: 1302-1305.

Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1998. Effects of plant composition and diversity on nutrient cycling. *Ecological Monographs* 68: 121-149.

Hubbell, S.P., 2001. A unified theory of biodiversity and biogeography. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.

Huston, M.A., 1994. Biological diversity: the coexistence of species on changing landscape. Cambridge Univ. Press.

Huston, M.A., 1997. Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* 110: 449-460.

Hutchinson, G.E., 1959. Homage to Santa Rosalia, or why are there so many kinds of animals? *The American Naturalist* 93: 145-159.

Johnse, K., Jacobsen, C.S., Torsvik, V., Sørensen, J., 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility Soils* 33: 443-453.

Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163: 459-480.

Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal* 3: 442-453.

Keller, L., Surette, M.G., 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 4: 249-258.

Kennedy, A.C., Papendick, R.I., 1995. Microbial characteristics of soil quality. *J Soil Water Conserv* 50: 243-248.

Knops, J.M.H., Tilman, D., Haddad, N.M., Naeem, S., Mitchell, C.E., Haarstad, J., Ritchie, M.E., Howe, K.M., Reich, P.B., Siemann, E., Groth, J. 1999. Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundances and diversity. *Ecology Letters* 2: 286-293.

Lavorel, S., Garnier E., 2001. Aardvarck to *Zyzyxia*: functional groups across kingdoms. *New Phytologist* 149: 360-364.

Levine, J.M., D'Antonio, C.M., 2000. Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility *The Quarterly Review of Biology* 78: 419-433.

Liesack, W., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Stackebrandt, E., 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H., (Eds.), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker, New York, pp. 375-439.

Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., 2002. Biodiversity and ecosystem functioning: synthesis and perspectives. Oxford University Press.

Lubchenco, J., 1978. Plant species diversity in a marine intertidal community: importance of herbivore food preference and algal competitive abilities *The American Naturalist* 112: 23-39.

Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 1-10.

Mazzoleni, S., Bonanomi, G., Giannino, F., Rietkerk, M., Dekker, Zucconi, F., 2007. Is plant biodiversity driven by decomposition processes? An emerging new theory on plant diversity. *Community Ecology* 8: 103-109.

McGrady-Steed, J., Harris, P.M., Morin, P.J., 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature* 390: 162-165.

Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 73: 127-141.

Naeem, S., Knops, J.M.H., Tilman, D., Howe, K.M., Kennedy, T., Gale, S., 2000. Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors. *Oikos* 91:97-108.

Naeem, S., Thompson, L.J., Lawler, S.P., Lawton, J.H., Woodfin, R.M., 1994. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems *Nature* 368:734-737.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Sc*ience 54: 655-670.

Nelson, E.B., 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42: 271-309.

O'Donnell, A.G., **Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J.T., 2001.** Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant & Soil* 232: 135-145.

Odum, E., 1969. The strategy of ecosystem development *Science* 164:262-270.

Perret, X., Staehelin, C., William, J.B. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology Molecular Biology Review* 64: 180-201.

Pimentel, D., **Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M., Crist, S., Shpritz, L., Fitton, L., Saffouri, R., Blair, R., 1995.** Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. *Science* 267: 1117-1123.

Pimentel, D., Lach, L. Zuniga, R., Morrison, D., 2000. Environmental and economic cost of non indigenous species in the United States. *Bioscience* 50:53-65.

Pimm, S.L., Russell, G.J., Gittleman, J.L., Brooks, T.M., 1995. The future of biodiversity. *Science* 269: 347-350.

Post, W.M., Izarurralde, R.C., Jastrow, J.D., McCarl, B.A., Amonette, J.E., Bailey, V.L., Jardien, P.M., West, T.O., Zhou, J., 2004. Enhancement of carbon sequestration in U.S. Soils. *BioScience* 54: 895–908.

Schlapfer, F., **Schmid, B., 1999.** Ecosystem effects. A classification of hypotesis and cross-system exploration of empirical results. *Ecological Applications* 9: 893-912.

Schonfeld, J., Gelsomino, A., van Overbeek, L.S., Gorissen, A., Smalla, K., van Elsas, J.D., 2002. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microbiological Ecology* 43: 63-74.

Setäla, H., McLean, M.A., 2004. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* 139: 98-107.

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis. Second Edition,

Academic Press.

Sprent, J.I., 2001. Nodulation in legumes. Royal Bototanical Gardens, Kew, UK.

Stephan, A., Meyer, A.H., Schmid, B., 2000. Plant diversity positively affects soil bacterial diversity in experimental grassland ecosystems. *Journal of Ecology* 88: 988-998.

Tate, R.L., 1997. Soil microbial diversity research: whither to now? *Soil Science* 162: 605-606.

Tilman, D., 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80: 1455-1474.

Tilman, D., Downing, J.A., 1994. Biodiversity and stability in grassland. *Nature* 367: 363-365.

Tilman, D., Reich, P.B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C., 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment Science 294:843-845.

Tilman, D., Wedin, D., Knops, J., 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems *Nature* 379: 718-720.

Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecology Letters* 8: 618-625.

Torsvik, V.L., **Sørheim R., Goksoyr, J. 1996.** Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 170-178.

Trenbath, B.R., 1974. Biomass productivity of mixtures. *Advances in Agronomy* 26: 177-210.

van der Heijden, M.G.A., **Bardgett, R.D., van Straalen, N.M., 2008.** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.

van Elsas, J.D., Duarte, G.E., Rosado, A.S., Smalla, K., 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32: 133-54.

Walker, L.R., 1993. Nitrogen fixers and species replacements in primary succession. In: Miles J, Walton DWH (ed), Primary succession on land. Blackwell Scientific.

Wardle, D.A., 1999. Is "sampling effect" a problem for experiments investigating biodiversity-ecosystem function relationships? *Oikos* 87: 403-407.

Wardle, D.A., 2001. Experimental demonstration that plant diversity reduces invasibility – evidence of a biological mechanism or a consequence of sampling effect? *Oikos* 95: 161-170.

Wardle, D.A., Giller, K.E., 1996. The quest for a contemporary ecological dimension to soil biology – Discussion. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1549-1554.

Weller, D.M., **Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M, Thomashow, L.S., 2002.** Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-349.

Widmer, F., **Fliessbach, A., Laczko, E., SchulzeAurich, J., Zeyer, J., 2001.** Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA, PLFA, and Biolog™ analyses. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1029-1036.

Wilson, E.O., 1993. La diversità della vita. Rizzoli.

Wintzingerode, F.V., Gobel, U.B., Staackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiological Reviews* 21: 213-229.

Wright, J.S., 2002. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia* 130: 1-14.

Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29 :111-129.

Zhang, L., **Xu, Z.H., 2008.** Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils Sediments* 8: 379-388.

CAPITOLO 2

Diversità microbica e decomposizione della lettiera

2.1. Il processo di decomposizione

Nonostante il grande interesse per la relazione tra biodiversità e funzioni ecosistemiche come la produttività primaria (Tilman et al. 2001), la stabilità (McGrady-Steed et al. 1997) e l'invasibilità da parte di specie aliene (Jiang & Morin 2004), è ancora poco indagata l'influenza della diversità sul livello di decomposizione della sostanza organica del suolo.

La decomposizione della lettiera determina la mineralizzazione della sostanza organica e, restituendo i nutrienti in forma inorganica prontamente utilizzabili dalle piante, contribuisce a mantenere la produzione primaria dell'ecosistema naturale e dell'agroecosistema. Il bilancio tra produzione primaria e velocità di decomposizione regola la quantità di sostanza organica accumulata nel suolo (Incerti et al. 2011a). I residui vegetali rappresentano un'importante risorsa di nutrienti sia in sistemi naturali che in sistemi agricoli, nei quali la sincronia tra la crescita delle piante e la decomposizione della lettiera è essenziale per il mantenimento della fertilità del suolo (Bonanomi et al. 2011a). La decomposizione, comunemente espressa come perdita di peso della lettiera nel tempo, comprende tre processi fondamentali (Swift et al. 1979):

- lisciviazione: processo abiotico che comporta la rimozione del materiale idrosolubile dalla lettiera ad opera dell'acqua piovana e responsabile della rapida perdita di peso durante le fasi iniziali della decomposizione;

- frammentazione: riduzione meccanica delle dimensioni della lettiera, operata dai detritivori, che la masticano, la digeriscono parzialmente e la eliminano, rielaborata con le feci;
- catabolismo: insieme di reazioni che ossidano i composti organici presenti nella lettiera. Queste reazioni, operate dai microrganismi, possono determinare la completa degradazione della lettiera e portare alla liberazione di composti inorganici, oppure portare alla formazione di vari composti intermedi che vengono utilizzati per la biosintesi di tessuti microbici o entrano a far parte della materia organica del suolo.

2.1.1. I microrganismi decompositori

Il materiale vegetale non decomposto rappresenta un substrato facilmente disponibile sia per la fauna che per i microrganismi del suolo (Fig. 2.1). La fauna del suolo frammenta la lettiera, incrementando la superficie di attacco dei microrganismi e regola la diversità e la distribuzione della comunità microbiche attraverso la predazione. La macrofauna spostandosi nel terreno contribuisce al mantenimento dell'aerazione e il drenaggio, causando inoltre la ridistribuzione della materia organica lungo il profilo del suolo. Alcuni autori hanno suggerito l'esistenza di un effetto positivo della quantità e complessità delle popolazioni edafiche sulla decomposizione (Hättenschwiler et al. 2005). La principale attività di mineralizzazione però è svolta dalle comunità microbiche telluriche, principalmente funghi e batteri. Inoltre, la qualità chimica dei residui organici è un fattore chiave che controlla il tasso di decomposizione e il relativo rilascio di nutrienti della lettiera (Swift et al. 1979; Neely et al. 1991; Rovira & Vallejo 2007; Bonanomi et al. 2011b).

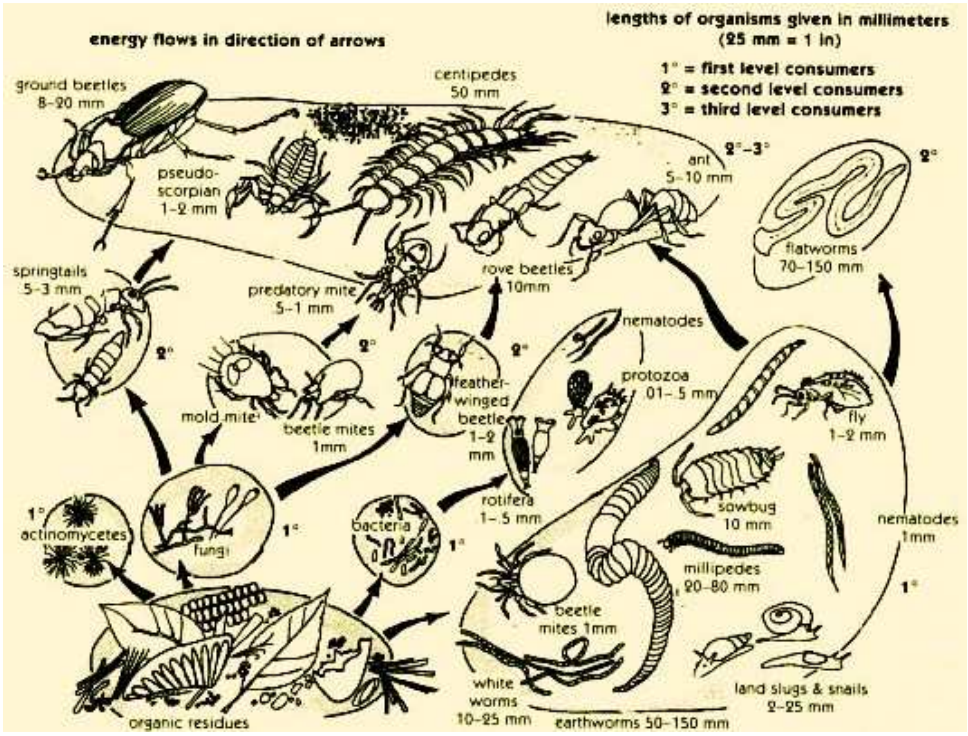

Figura 2.1. Catena alimentare semplificata degli organismi responsabili dei processi di decomposizione nel suolo. La figura indica la grande diversità funzionale di organismi che operano la decomposizione del detrito vegetale.

I microrganismi rilasciano enzimi litici che demoliscono i polimeri complessi della materia organica e assorbono i costituenti semplici derivati da tale processo. Tali prodotti sono poi utilizzati per crescita microbica. I funghi saprofiti svolgono un ruolo fondamentale nella decomposizione della lettiera vegetale perché riescono a degradare la frazione ricche di lignine e cellulose delle pareti cellulari dei vegetali, funzione che altri microrganismi non sono in grado di effettuare in maniera efficiente (Berg & McClaugherty 2008). La degradazione dei maggiori costituenti strutturali dei tessuti vegetali, come la cellulosa, le emicelluose e la lignina richiede sistemi enzimatici complessi che operano sinergicamente. Tali sistemi possono derivare da specie mcrobiche differenti che operano sinergicamente nel degradare sostanze organiche recalcitrati. Ad esempio alcuni studi hanno mostrato che la presenza di differenti microrganismi con caratteristiche

metaboliche complementari garantisce un'affidabilità maggiore della funzionalità del sistema in condizioni ambientali mutevoli in virtù della loro complementarietà funzionale (Brenner et al. 2008; Langenheder et al. 2010).

I cambiamenti nella qualità della sostanza organica che si osservano durante la decomposizione della lettiera inducono una successione temporale delle comunità microbiche che operano la decomposizione (Hudson 1968; Dix & Webster 1995; Dilly et al. 2001; Fierer et al. 2003). La diversità della microflora decompositrice spesso diminuisce con il procedere della decomposizione, in quanto specie più specializzate colonizzano i materiali organici più recalcitranti che risultano quindi più selettivi. L'attacco microbico alla lettiera avviene precocemente, spesso quando il fogliame senescente è ancora attaccato alla pianta (Jensen 1974). Il processo comincia normalmente con la colonizzazione da parte di batteri, attinomiceti e funghi imperfetti (Deuteromiceti), tutti microrganismi che degradano i composti più semplici come gli zuccheri, gli aminoacidi e le proteine (Garrett 1963). Successivamente vengono degradate le emicellulose e le cellulose. Le emicellulose presente nei tessuti non lignificati vengono degradate più velocemente. A questo punto, le risorse rimanenti risultano meno diffusibili in acqua e più sono chimicamente più resistenti alla biodegradazione (Berg & McClaugherty 2008). In seguito, la rimanente lettiera residuale, caratterizzata da un elevato livello di lignificazione (Berg & Matzner 1997; Bonanomi et al. 2011c), viene colonizzata soprattutto dai basidiomiceti responsabili del *marciume bruno* e del *marciume bianco* e dagli ascomiceti del *marciume molle* che sono in grado di degradarla ulteriormente (Berg & McClaugherty 2008). La lignina, data la sua complessa struttura (Kögel-Knabner 2002), è un materiale particolarmente resistente all'attacco biologico e la sua degradazione dipende dalla velocità con cui le ife fungine riescono a penetrare le pareti

cellulari lignificate. Le rimanenti sostanze altamente recalcitranti diventano parte della sostanza organica del suolo. Tali evidenze indicano che il processo di decomposizione è strettamente legato alla qualità biochimica della lettiera che varia quindi con la specie, con l'età e con l'organo della specie vegetale considerata. In tale contesto è importante ricordare che sono oggi disponibili approcci analitici che permettono di caratterizzare a livello molecolare la sostanza organica in decomposizione. In particolare, l'utilizzo della pirolisi-gas cromatografia/spettrometria di massa (Huang et al., 1998), la spettroscopia dell'infrarosso vicino (NIR) (Gillon et al., 1999) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare in fase solida, detta anche ^{13}C-cross-polarization magic angle spinning (CPMAS) (Kögel-Knabner, 2002) sono state utilizzate per caratterizzare la sostanza organica di origine vegetale. Ad esempio alcuni studi hanno dimostrato attraverso l'utilizzo della ^{13}C-CPMAS NMR che la qualità della lettiera si modifica in maniera continua e sostanziale durante la decomposizione. In particolare è stata rilevata una riduzione dei carboidrati ed un aumento della frazione aromatica ed alifatica (Almendros et al., 2000; Preston et al., 2009; Ono et al., 2011). Come conseguenza di tali cambiamenti chimici si alternano anche le proprietà funzionali della lettiera, con una riduzione del tasso di decomposizione e della fitotossicità della sostanza organica (Bonanomi et al. 2011c). Tali tecniche innovative sono quindi complementari alle classiche analisi della lettiera basate sulla digestione acida delle diverse frazioni organiche (Gessner 2005).

Oltre alla qualità del carbonio organico, un importante ruolo nel processo di decomposizione è svolto dalla disponibilità di nutrienti. In letteratura è riportato che il contenuto di azoto (N) ed i rapporti C/N e lignina/N sono dei parametri importanti per prevedere il tasso d decomposizione e il relativo rilascio di nutrienti. (Meentemeyer 1978; Melillo et al. 1982; Taylor et al. 1989; Parton et al. 2007). Per i residui

radicali è stata riportata una forte correlazione positiva tra la perdita di peso e il contenuto di Ca^{++} (Silver & Miya 2001). Inoltre, la presenza di microelementi (Mo, Cu, Zn, Fe) e macronutrienti (N, P e K) e di molecole recalcitranti (chitine, emicellulose e lignina) regolano la velocità della degradazione e la dinamica di rilascio e immobilizzazione dei nutrienti stessi (Rutigliano et al. 1996).

E' importante però ricordare che anche i fattori climatici influenzano notevolmente il processo decomposizione. In particolare la temperatura e l'umidità sono i due fattori che maggiormente limitano la velocità di decomposizione in condizioni naturali (Aerts 1997; Gholz et al 2000). Ad esempio, in condizioni di clima mediterraneo la decomposizione della lettiera è limitata dalle basse temperature durante l'inverno (Criquet et al. 2004) e dalla scarsità di acqua durante i mesi estivi (Incerti et al. 2011a).

2.1.2. Diversità della lettiera e decomposizione

Nonostante lo strato di lettiera nelle comunità vegetali naturali sia generalmente costituito da più di specie vegetali contemporaneamente (Fig. 2.2.), la maggior parte degli studi di decomposizione disponibili ha riportato analisi condotte su singole specie vegetali (Berg & McClaugherty 2008). L'effetto di lettiere miste sulla decomposizione è stato indagato per la prima volta circa 70 anni fa (Gustafson 1943) e recentemente l'importanza ecologica di tale aspetto è stato rivalutata (Gartner & Cardon 2004; Hättenschwiler et al. 2005).

La perdita di peso ed il rilascio di nutrienti sono influenzati dalla diversità della lettiera attraverso tre principali meccanismi. In primo luogo, la diffusione passiva o il trasporto attivo microbico dei nutrienti tra materiali diversi può aumentare il tasso di decomposizione di lettiera povera di nutrienti (Chapman et al. 1988; Wardle et al. 1997). Inoltre, la maggiore capacità di ritenzione dell'acqua di alcuni tipi di lettiera può avvantaggiare

la decomposizione di altri residui vegetali (Wardle et al. 2003). Infine, la decomposizione della lettiera mista può essere più lenta rispetto a quella rilevabile in coltura pura per il rilascio, da parte di alcune lettiere, di composti con attività antimicrobica come i tannini e i polifenoli (Schimel et al. 1998).

Figura 2.2. Immagine di un sottobosco con la presenza di più specie vegetali come faggio (*Fagus sylvatica*), acero (*Acer* sp.), sorbo (*Sorbus aria*) e cerro (*Quercus cerris*). La contemporanea presenza di lettiere differenti permette un continuo scambio di nutrienti e metaboliti con effetti sulla velocità di decomposizione.

Recentemente, Bonanomi et al. (2010) hanno condotto un esperimento di decomposizione con il metodo delle litterbag utilizzando mescolanze di quattro lettiere di specie vegetali mediterranee (*Coronilla emerus*, *Hedera helix*, *Festuca drymeia* e *Quercus ilex*). Tutte le lettiere singolarmente, tutte le possibili combinazioni da due specie e cinque mescolanze a quattro specie sono state decomposte per 120 giorni in condizioni controllate di umidità e temperatura. Infine, la decomposizione è stata valutata tramite la determinazione della perdita di peso (%) e della variazione nelle concentrazioni di C, N, K, Ca, Mg e Fe. In base al rilascio dei nutrienti, questo studio, il primo condotto per le specie mediterranee, conferma che il tipo di lettiera, nei primi stadi di decomposizione, è il fattore più

importante. Anche la diversità della lettiera però influiva notevolmente sul rilascio dei nutrienti e sulla perdita di peso, con casi di interazoni additive (le colture miste decomponevano come quelle pure), sinergiche (decomposizione più rapida in coltura mista) e antagonistiche (decomposizione più lenta in coltura mista).

In tale contesto alcuni autori hanno ipotizzato che aumento della diversità delle specie vegetali dovrebbe comportare un aumento della biomassa e della diversità tassonomica e funzionale delle comunità microbiche (Setäla 2002). Evidenze sperimentali a supporto di tale ipotesi sono comunque scarse (Hättenschwiler et al. 2005).

2.1.3. Diversità microbica e decomposizione della lettiera

Un gran numero di microrganismi è coinvolto nella degradazione della sostanza organica del suolo (van der Heijden et al. 2008), ma finora solo un numero limitato di studi ha indagato l'effetto della diversità dei microbi decompositori sul tasso di decomposizione. Alcune evidenze suggeriscono che le comunità di funghi tellurici degradano la sostanza organica più velocemente rispetto a popolazioni di funghi in monocoltura (Deacon 1985; Robinson et al. 1993). Inoltre, alcuni autori hanno ipotizzato che una riduzione nella complessità funzionale della microflora tellurica potrebbe tradursi in una ridotta attività di questa con conseguenze negative sulla funzionalità degli agro-ecosistemi (Degens 1998; Griffiths et al. 2000). Sono comunque pochi i lavori che hanno esplicitamente indagato gli effetti della diversità microbica sulle funzioni ecosistemiche, tra cui la decomposizione, attraverso l'approccio delle comunità sintetiche (Tiunov & Scheu 2005). Ad esempio, Dang et al. (2005) hanno assemblato comunità a partire da un pool di 14 specie di ifomiceti acquatici isolati da corsi d'acqua del Sud della Francia. L'esperimento è stato congeniato in modo da simulare la decomposizione della lettiera in ambiente acquatico.

Utilizzando ogni volta 12 dei 14 ifomiceti sono state assemblate, per i tre esperimenti condotti, 9 comunità a 4 livelli di diversità (comunità costituite da 2, 4, 6 e 8 specie contemporaneamente). Tutte le specie utilizzate sono state saggiate anche in monocoltura. La decomposizione è stata valutata in base al calo peso subito da frammenti di foglie di ontano e rovere. I risultati hanno mostrato che la perdita di peso della lettiera non aumentava con la diversità. Al contrario la stabilità nella capacità di decomposizione, quantificata attraverso il coefficiente di variabilità calcolato entro ogni livello di diversità, aumentava con la diversità.

La maggior parte degli studi presenti in letteratura volti a definire le relazioni tra biodiversità e funzioni ecosistemiche utilizzano solo una limitata frazione della diversità microbica esistente per allestire comunità sintetiche con differente diversità. In particolare molti studi hanno utilizzato poche specie microbiche (di solito meno di dieci) rispetto a quelle comunemente osservate nelle comunità naturali (e.g. Frankland 1992; Dilly et al. 2004) e brevi periodi di decomposizione, dell'ordine di grandezza di poche settimane, rispetto ai classici studi di decomposizione (Berg & McClaugherty 2008). Un ulteriore limite degli studi presenti in letteratura è che molti sono condotti in sistemi acquatici e utilizzando un gruppo specifico di funghi, gli ifomiceti (Bärlocher & Corkum 2003; Dang et al. 2005; Duarte et al. 2006; Costantini & Rossi 2010). Sebbene la scelta degli ifomiceti permetta alcuni vantaggi tecnici come la possibilità di quantificare le popolazioni delle diverse specie in coltura mista grazie ai peculiari caratteri morfologici, questo riduce drasticamente la possibilità di comprendere l'importanza della diversità negli ecosistemi terrestri (Replansky & Bell 2009). Tra le poche eccezioni ricordiamo lo studi di Setäla & McLean (2004) che ha utilizzato funghi tellurici. In questo caso il numero di specie di funghi tellurici è stato messo in relazione all'abilità del

sistema di degradare humus (valutata come rilascio di CO_2) di una foresta di conifere. Scegliendo a caso da un pool di 43 fungi isolati da humus fresco, sono state assemblate 6 comunità sintetiche (diversità specifica di 1, 3, 6, 12, 24 e 43 specie). In generale, il tasso di decomposizione era correlato positivamente al numero di specie fungine presenti nelle comunità sintetiche. In altre parole, i microcosmi in cui erano state inoculate le specie singole rilasciano meno CO_2 rispetto ai microcosmi con comunità miste. E' importante comunque ricordare che la massima respirazione si rilevava già con le comunità composte da 3 e 6 specie, indicando come la curva di diversità-respirazione si saturasse a bassi livelli di diversità.

Ancora meno numerosi sono poi gli studi che hanno utilizzato l'approccio delle comunità sintetiche con i batteri. Recentemente, Langenheder et al. (2010) hanno indagato l'effetto della diversità batterica sulla degradazione di molecole organiche semplici (glucosio, xylosio e galattosio). Tramite analisi spettrofotometrica, è stata quantificata la riduzione degli zuccheri a seguito dell'attività microbica. Partendo da un pool di 6 batteri, nell'esperimento sono state incluse tutte le possibili combinazioni per ogni livello di diversità microbica (n=6) e tutte le possibili combinazioni tra substrati (n=3). L'attività metabolica delle comunità aumenta significativamente con tempo, indipendentemente dal livello di diversità, e ciò indica un effetto cumulativo nel corso dell'esperimento. Anche la ricchezza di specie però mostrava un effetto positivo sull'attività catabolica che aumenta nel corso dell'incubazione. Inoltre, la variabilità dei risultati aumenta nel tempo ma diminuiva con il numero di specie batteri presenti nelle comunità. In un ulteriore studio, Bell et al. (2005) hanno indagato l'effetto della biodiversità batterica sul funzionamento di comunità microbiche sintetiche contenenti fino a 72 specie colturabili. La respirazione giornaliera è stata scelta come misura del funzionamento del sistema. La media giornaliera della respirazione

batterica aumentava rapidamente con l'aumento della ricchezza di specie dalle monoculture fino a 18 specie, ma l'incremento diminuiva quando la diversità raggiungeva le 72 specie.

Da tale breve disamina della letteratura disponibile risulta evidente che non sono stati condotti studi che utilizzano contemporaneamente funghi e batteri, sebbene questi due gruppi funzionali coesistano nella maggior parte degli ecosistemi.

2.1.4. Obiettivi dello studio

Lo studio aveva come obiettivo generale indagate la relazione fra diversità microbica, in presenza di fattori di ambientali variabili, e decomposizione della materia organica. A tale fine è stato selezionato l'approccio delle comunità sintetiche utilizzando comunità con elevati livelli di complessità (da 1 fino a 64 specie presenti contemporaneamente) che includessero sia funghi che batteri. Le specifiche ipotesi che sono state indagate erano: (1) il tasso di decomposizione della lettiera aumentava con la diversità microbica?; (2) l'effetto della diversità dipende dalle condizioni ambitali di temperatura e qualità della sostanza organica?; (3) la variabilità nel processo di decomposizione è legato alla diversità microbica?

Ulteriore obiettivo dello studio è stato valutare se la diversità di materiali organici influisse sulla velocità di decomposizione della lettiera stessa. A tale fine è stato condotto un esperimento dove quattro materiali organici sono stati decomposti per 360 giorni in monocoltura ed in colture miste.

2.2. Materiali e metodi

2.2.1 Effetto della diversità microbica sulla decomposizione della lettiera

L'effetto della diversità microbica sulla decomposizione della lettiera è stata indagata attraverso una serie di esperimenti condotti con l'approccio delle comunità microbiche sintetiche in condizioni controllate di temperatura ed umidità. La decomposizione è stata sempre valutata in base alla perdita di peso subito dalle lettiere durante il corso degli esperimenti. Nel complesso sono stati condotti tre esperimenti. Nel primo le comunità sintetiche erano costituite solo da funghi, nel secondo solo da batteri e nel terzo da funghi e batteri contemporaneamente.

2.2.1.1. Selezione e caratterizzazione chimica dei substrati organici

La prove di decomposizione sono state sempre condotte con quattro matrici organiche scelte in maniera da avere un ampio gradiente di diversità chimica:

i. lettiera di foglie di edera (*Hedera helix* L.), una pianta rampicante sempreverde facilmente decomponibile;

ii. lettiera di foglie di leccio (*Quercus ilex* L.), pianta sempreverde a decomposizione lenta (Bonanomi et al. 2010);

iii. frammenti di legno (*Quercus ilex*);

iv. strisce di cellulosa (carta da filtro Watman).

La raccolta del materiale vegetale è stata effettuata nel Parco Gussone presso la Facoltà di Agraria di Portici. Le foglie senescenti sono state raccolte tramite reti poste sotto le piante in comunità naturali. La raccolta del materiale vegetale è stato effettuato da più di 20 piante per ciascuna specie. Le foglie e i pezzetti di carta e legno sono stati prima asciugati in stufa (40°C fino al raggiungimento di un peso costante), poi ridotti in

frammenti di 0,1 g e infine autoclavati e conservati a temperatura ambiente in condizioni sterili. Le lettiere indecomposte (*H. helix* e *Q. ilex*) sono state caratterizzate per il contenuto totale di C e N tramite combustione rapida e completa (Flash) di micro campioni (5 mg di lettiera) in un Analizzatore elementare NA 1500 (Carlo Erba Strumentazione, Milano, Italia). Il contenuto di carbonio labile, cellulosa e lignina è stato valutato come frazione acida idrolizzabile e materiale acido non idrolizzabile (Gessner 2005). Infine, le lettiere indecomposte oltre alla cellulosa e ai frammenti di legno sono state caratterizzati anche tramite ^{13}C-CPMAS NMR (per dettagli vedi Bonanomi et al. 2011c). Le analisi NMR sono state condotte grazie al supporto tecnico della Professoressa Virginia Lanzotti presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca "CERMANU".

2.2.1.2. Selezione dei microrganismi

Da campioni di suoli prelevato nel Parco Gussone di Portici e presso alcune aziende agricole della piana del Sele (vedi Bonanomi et al. 2011a per la caratterizzazione dei suoli) sono stati selezionati i pool di funghi (n=32) e batteri (n=32). I microrganismi sono stati classificati in base a: (i) gruppo di microrganismi; (ii) strategia di sviluppo r e K; e (iii) attività trofica. Utilizzando mezzi di coltura selettivi, realizzati modificando il pH, la concentrazione delle fonti di carbonio (zuccheri, lipidi, proteine) e aggiungendo antibiotici specifici sono stati isolati batteri e funghi con differenti capacità trofiche (proteolitica, ligninolitica, cellulosolitica, lipolitica; Tabella 2.1). I batteri e i funghi colturabili sono stati isolati su differenti mezzi agarizzati. Le sospensioni di suolo sono state preparate agitando (200 rpm) 5 g di suolo setacciato con 50 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9% p/v) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo questa fase, i campioni sono stati serialmente. Volumi di 100 µl delle diluizioni sono stati applicati su differenti substrati (Tabella 2.1.).

		Additivi			
Gruppo microbico	**Substrato base**	**Cellulosolitici**	**Lipolitici**	**Proteolitici**	**Ligninolitici**
Funghi	WA 50ppm cloramfenicolo 50ppm streptomicina	+0,1% cellulosa	+0,1% olio di semi	+0,1% peptone	+0,1% lignina
Batteri	WA 100ppm Actidione	+0,1% cellulosa	+0,1% olio di semi	+0,1% peptone	+0,1% lignina

Tabella 2.1. Elenco dei substrati selettivi utilizzati per isolare i diversi gruppi microbici con attività trofiche diversificate.

Figura 2.3. Immagine di alcuni isolati fungini e conservati in coltura pura su substrato standard (PDA).

Le colture dei microbi selezionati sono state conservate in acqua e glicerolo (50:50) a -20°C. Prima dell'inoculo nei microcosmi, le collezioni di batteri e funghi sono state scongelate e inocultate su substrati standard (PDA per i funghi e LB per i batteri). In figura 2.2. sono riportale le immagini di alcune colture fungine. Gli isolati batterici sono stati identificati tramite il sistema Biolog™ (Biolog, Inc., Hayward, California, USA).

2.2.1.3. Identificazione molecolare delle specie fungine

Per l'identificazione molecolare dei funghi isolati è stata condotta l'analisi genetica delle sequenze ITS del DNA ribosomiale (Kebli et al. 2011). Le spore dei funghi sono state inoculate in PDB (Potato Dextrose Broth, Sigma) e incubate a 25°C su un agitatore orbitale (250 rpm) per cinque giorni. La biomassa è stata raccolta separando il substrato per filtrazione con carta Miracloth (Calbiochem), lavata ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugata con carta assorbente. Il micelio è stato dapprima tenuto a -20°C per 24 ore e poi posto in tubi in polipropilene da 50 ml a liofilizzare. La biomassa liofilizzata è stata polverizzata con l'ausilio di una spatola e immediatamente sottoposta ad estrazione del DNA. Un grammo di micelio liofilizzato è stato sospeso in 10 ml di buffer di estrazione (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% pH 7.5), al quale sono stati aggiunti 5 ml di fenolo e 5 ml di cloroformio-alcool isoamilico (24:1). La sospensione è stata agitata delicatamente e quindi centrifugata a 4° C per 30 minuti a 12000 rpm. La fase acquosa recuperata è stata digerita con 50µl di RNasi (10 mg/ml) per 1 ora a 37° C. Terminata la digestione sono stati aggiunti 10 ml di fenolo-cloroformio, il campione è stato agitato delicatamente e centrifugato nuovamente. La fase acquosa è stata sottoposta ad una nuova estrazione fenolo-cloroformio e ad una con solo cloroformio. Alla fase acquosa recuperata (contenente il DNA genomico) è stato aggiunto isopropanolo e il tutto è stato centrifugato a temperatura ambiente

per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, lasciato asciugare e poi risospeso in T3E (Tris 10 mM - EDTA 10 mM, pH 8.0). Il DNA ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi su gel d'agarosio per comparazione con un DNA standard. La PCR è stata effettuata con l'utilizzo dei primer SR6R (5'-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3') e LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3'), frammenti che contengono le regioni ITS: ITS 1 (ITS-1), la 5,8 S rDNA e la ITS-2. Per la PCR Sono stati utilizzati i seguenti parametri: denaturazione a 94°C per 2 minuti, 30 cicli di amplificazione 30 secondi di denaturazione a 94°C, 45 secondi appaiamento dei primer at 50°C, 60 secondi di allungamento a 72°C e un allungamento finale di 10 minuti a 72°C. I prodotti di PCR sono stati separati con elettroforesi in gel di agarosio per la quantificazione e per stabilire la specificità della PCR. Gli amplificati sono stati soggetti a sequenziamento presso il Centro GENOPOM. L'allineamento delle sequenze e lo studio filogenetico è stato svolto tramite l'uso del software BLASTn sulla banca dati NCBI.

2.2.1.4. Disegno sperimentale e assemblaggio delle comunità microbiche

Gli esperimenti sono stati condotto in microcosmi progettati per simulare la decomposizione della lettiera in ambiente terrestre. Nel complesso sono stati effettuati tre esperimenti, il primo solo con funghi, il secondo solo con batteri ed il terzo con funghi e batteri contemporaneamente. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alle temperature di 12 e 24°C in condizioni di umidità non limitanti (microcosmi irrigati ogni 7 giorni con acqua distillata sterile). I microcosmi erano costituiti da piastre sterili, ognuna delle quali conteneva 6 frammenti di lettiera di 0,1 g di ciascuna delle matrici organiche (legno, cellulosa, edera e leccio; Fig. 2.4). Le lettiere in decomposizione sono state campionate dopo 10, 40 e 120 giorni di

decomposizione. Il materiale campionato è stato successivamente essiccato a 40°C fino a raggiungere peso costante e quindi pesato.

Le specie microbiche sono state prelevate dai pool riportati in Tabella 2.2 e 2.3.

N°	Specie	N°	Specie
1	*Aspergillus caespitosus*	**17**	*Umbelopsis ramanniana*
2	*Aspergillus carbonarius*	**18**	*Fusarium solani*
3	*Aspergillus flavus*	**19**	*Fusarium oxysporum*
4	*Aspergillus niger*	**20**	*Fusarium* sp.
5	*Aspergillus terreus*	**21**	*Pesotum* sp.
6	*Aspergillus versicolor*	**22**	*Alternaria alternata*
7	*Aspergillus wentii*	**23**	*Bortytis cinerea*
8	*Ganoderma lucidum*	**24**	Fungo non identificato_1
9	*Mucor* sp.	**25**	Fungo non identificato_2
10	*Penicillium chrysogenum*	**26**	Fungo non identificato_3
11	*Penicillium expansum*	**27**	Fungo non identificato_4
12	*Penicillium restrictum*	**28**	Fungo non identificato_5
13	*Penicillium sp.*	**29**	Fungo non identificato_6
14	*Trichoderma atroviride*	**30**	Fungo non identificato_7
15	*Trichoderma harzianum*	**31**	Fungo non identificato_8
16	*Xylaria* sp.	**32**	Fungo non identificato_9

Tabella 2.2. Elenco dei funghi utilizzati per assemblare i consorzi negli esperimenti di decomposizione della lettiera. I funghi sono stati selezionati da suoli naturali e di agro-ecosistemi.

N°	Specie	N°	Specie
1	*Agrobacterium* sp.	**17**	*Bacillus* sp.
2	*Arthrobacter* sp.	**18**	*Serratia rubidaea*
3	*Bacillus amyloliquefaciens*	**19**	*Pseudomonas* sp.
4	*Bacillus subtilis*	**20**	Batterio non identificato_1
5	*Enterobacter erogene*	**21**	Batterio non identificato_2
6	*Lysobacter* sp.	**22**	Batterio non identificato_3
7	*Pseudomonas chlororaphis*	**23**	Batterio non identificato_4
8	*Pseudomonas fluorescens*	**24**	Batterio non identificato_5
9	*Pseudomonas tolaasii*	**25**	Batterio non identificato_6
10	*Pseudomonas putida*	**26**	Batterio non identificato_7
11	*Pseudomonas fulva*	**27**	Batterio non identificato_8
12	*Pseudomonas synxantha*	**28**	Batterio non identificato_9
13	*Pseudomonas viridilivida*	**29**	Batterio non identificato_10
14	*Stenotrophomonas maltophilia*	**30**	Batterio non identificato_11
15	*Lysobacter capsici*	**31**	Batterio non identificato_12
16	*Bacillus badius*	**32**	Batterio non identificato_13

Tabella 2.3. Elenco dei batteri utilizzati per assemblare i consorzi negli esperimenti di decomposizione della lettiera. Parte dei batteri sono stati selezionati da suoli e parte sono stati prelevati dalla collezione del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale.

I primi due esperimenti prevedevano quattro livelli di diversità (1, 2, 8 e 32 specie), mentre il terzo con funghi e batteri contemporaneamente utilizzava cinque livelli di diversità (1, 2, 8, 32 e 64 specie). Le comunità sintetiche sono state assemblate a caso prelevando a caso le specie dai pool microbici in quanto effettuare tutte le possibili combinazioni di 32 e 64 specie è logisticamente non possibile (Bell et al. 2005). Con l'eccezione delle comunità a maggior diversità che sono state replicate due volte con la stessa composizione, ad ogni livello di diversità sono state effettuate otto repliche. In tale contesto è importante ricordare che l'assemblaggio a caso è cruciale per testare l'effetto della diversità (Huston 1997). Infatti, nel caso che le

comunità non siano assemblate a caso non è possibile testare l'effetto della diversità *per se*, bensì si vanno a valutare i principi che erano alla base dell'assemblaggio. L'assemblaggio delle comunità sintetiche è stato condotto in maniera che tutte le monoculture (comunità costituite da una sola specie microbica) dei pool erano presenti. Questo è un requisito fondamentale per valutare se l'effetto della diversità è dovuto all'effetto di campionamento (*sampling effect*) o alla complementarietà (*niche complementarity*) fra le specie microbiche (Wardle 1999). Infine, tutti gli esperimenti includevano un ulteriore controllo effettuato con una comunità microbica naturale ottenuta dai suoli da cui i microrganismi erano stati selezionati.

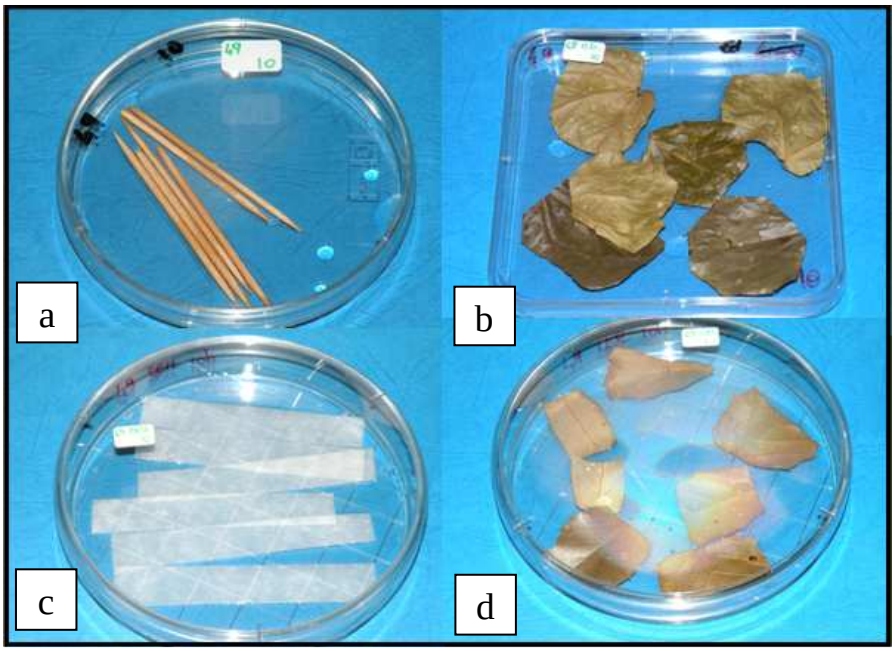

Figura 2.4. Microcosmi allestiti in piastre Petri con le quattro matrici organiche: pezzi di legno; b. foglie di edera; c. carta da filtro; d. foglie di leccio sono state inoculate con le comunità microbiche sintetiche.

Nel complesso il primo (funghi) ed il secondo (batteri) esperimento erano costituiti da 1,224 microcosmi (51 combinazioni microbiche x 4 materiali organici x 2 temperature x 3 tempi di decomposizione). Il terzo esperimento con funghi e batteri inoculati contemporaneamente era invece costituito da

2,184 microcosmi (91 combinazioni microbiche x 4 materiali organici x 2 temperature x 3 tempi di decomposizione). Complessivamente sono stati decomposti ed analizzati per la perdita di peso 13,896 pezzi di lettiera. A causa dell'elevato numero di microcosmi (complessivamente n=4,632), la determinazione della ricchezza di specie "realizzata" (i.e. il numero di specie che realmente si sviluppavano nei microcosmi; Tiunov & Scheu 2005) non è stato possibile perché risultava non fattibile dal punto di vista logistico oltre che economico. La presenza di microrganismi contaminanti è stata periodicamente valutata (dopo 10, 40 e 120 giorni) tramite analisi microscopica e l'utilizzo di substrati di coltivazione. In Tabella 2.4 e 2.5 sono riportati sinteticamente gli schemi sperimentali dei tre esperimenti.

Numero di specie nelle comunità	Numero di combinazioni	Numero di repliche identiche	Microcosmi totali
1	32	1	32
2	8	1	8
8	8	1	8
32	1	2	2
Inoculo naturale	1	1	1
TOTALE	50	-	51

Tabella 2.4. Disegno sperimentale dell'esperimento di decomposizione condotto con specie fungine e specie batteriche inoculate separatamente. Gli esperimenti sono stati condotti a due temperature (12 e 24°C) con quattro matrici organiche per complessivi 120 giorni di decomposizione.

Numero di specie nelle comunità	Numero di combinazioni	Numero di repliche identiche	Microcosmi totali
1	64	1	64
2	8	1	8
8	8	1	8
32	8	1	8
64	1	2	2
Inoculo naturale	1	1	1
TOTALE	90	-	91

Tabella 2.5. Disegno sperimentale dell'esperimento di decomposizione condotto con specie fungine e batteriche inoculate contemporaneamente. L'esperimento è stato condotto a due temperature (12 e 24°C) con quattro matrici organiche per complessivi 120 giorni di decomposizione.

I microcosmi sono stati inoculati mantenendo costante la concentrazione dei propaguli fungini e di cellule batteriche al variare della diversità microbica. Inoltre, in tutti gli esperimenti la concentrazione di inoculo iniziale è stata mantenuta relativamente bassa (1×10^3 mL^{-1} conidi per i funghi e 1×10^5 mL^{-1} cellule per i batteri) al fine di riprodurre un processo di colonizzazione dei materiali organici realistico dal punto di vista ecologico. Nei microcosmi inoculati con più di una specie, il numero di conidi/cellule batteriche inoculate per ogni specie è stato ridotto in proporzione al numero di specie contenuto nel consorzio (es. nel caso di consorzi con quattro specie microbiche, ogni fungo contribuiva con un ammontare di 2.5×10^2 conidi per un ammontare totale di 1×10^3 conidi). L'inoculo fungino è stato ottenuto da colture pure di circa 10 giorni cresciute su PDA. Su tali colture sono stati aggiunti 10 mL di acqua sterile e la superficie frizionata per rimuovere i conidi. La sospensione così ottenuta è stata filtrata, centrifugata e risciacquata tre volte in acqua sterile. Infine, la concentrazione di conidi è stata quantificata tramite emocitometro e successivamente portata a 1×10^5 conidi mL^{-1}. L'inoculo è stato effettuando applicando 500 µl delle

sospensioni condiche dopo diluizione finalizzata ad ottenere la concentrazione desiderata che era dipendente dal numero di specie dei consorzi microbici. L'inoculo batterico è stato ottenuto da colture pure delle diverse specie inoculate su NA e lasciate sviluppare per tre giorni a 20 °C. Successivamente, le sospensioni sono state centrifugate e risospese in soluzione fisiologica sterile. Al fine di ottenere le concentrazioni di inoculo desiderate, per ogni specie la densità ottica delle sospensioni è stata quantificata mediante spettrofotometro (λ 530 nm) confrontate con le rette di taratura e, quindi, opportunamente diluite. Infine, l'inoculo naturale è stato preparato agitando (200 rpm) 5 g di suolo setacciato con 50 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9% p/v) per 30 minuti.

2.2.1.5 Analisi dei dati

I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo dei modelli lineari generalizzati (GLM). In dettaglio, per tutti e tre gli esperimenti la temperatura (due livelli), il tempo di decomposizione (tre livelli), la ricchezza di specie dell'inoculo microbico (quattro o cinque livelli) e tipologia di substrato organico (quattro livelli) sono stati utilizzati come fattori predittivi nei modelli.

L'effetto della temperatura sulla decomposizione è stato valutato anche tramite il Q10 o coefficiente termico. Il Q10 è stato calcolato come segue:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

Dove R1 ed R2 sono le misure del tasso di decomposizione alla temperatura T1 e T2, rispettivamente (dove T1<T2). Se il tasso di decomposizione è completamente indipendente dalla temperatura, allora il Q10 sarà pari a 1. Il

Q10 per il processo di decomposizione è solitamente compreso nell'intervallo tra 1,5 e 6 (Fierer et al. 2005). Le analisi statistiche sopra descritte sono stata condotte con il supporto tecnico del Dott. Guido Incerti dell'Università di Trieste.

2.2.2. Esperimento di decomposizione di lettiere miste

Obiettivo di questo esperimento è stato valutare se la diversità di materiali organici influenza la velocità di decomposizione della lettiera stessa. A tale fine è stato condotto un esperimento dove quattro materiali organici (legno, cellulosa, lettiere di edera e di leccio) sono stati decomposti per 360 giorni in monocoltura ed in colture miste. In particolare, lo schema sperimentale includeva tutte le possibili combinazioni a coppie dei quattro materiali organici (combinazioni n=10; Tabella 2.6).

Combinazione dei materiali organici	*Quantità (g)*	*Tempi di decomposizione (giorni)*
Edera – Edera	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Edera - Leccio	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Edera - Cellulosa	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Edera - Legno	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Leccio - Leccio	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Leccio - Cellulosa	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Leccio - Legno	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Cellulosa - Cellulosa	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Cellulosa - Legno	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360
Legno - Legno	0,1 - 0,1	10-30-90-180-360

Tabella 2.6. Combinazioni dei materiali organici, quantità di lettiera e tempi di decomposizione utilizzati nell'esperimento di decomposizione delle lettiere miste.

L’esperimento è stato condotto in condizioni controllate a due temperature (12 e 24°C) in condizioni di umidità non limitanti (microcosmi irrigati ogni 7 giorni con acqua distillata sterile). I microcosmi erano costituiti da piastre sterili, ognuna delle quali conteneva 2 frammenti di lettiera di 0,1 g di ciascuna. I frammenti di lettiera sono stati posizionati in maniera che non si toccassero, ciò al fine di evitare uno scambio diretto di nutrienti e metaboliti fra i due frammenti.

Le lettiere in decomposizione sono state campionate dopo 10, 30, 90, 180 e 360 giorni di decomposizione. Il materiale campionato è stato successivamente essiccato a 40°C fino a raggiungere peso costante e quindi pesato. Complessivamente sono stati assemblati 500 microcosmi (5 tempi di decomposizione x 10 combinazioni x 2 temperature x 5 repliche). I microcosmi sono stati addizionati (10 mL) con l’inoculo naturale che è stato preparato agitando (200 rpm) 5 g di suolo setacciato con 50 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9% p/v) per 30 minuti.

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) a tre vie. In dettaglio per ogni materiali organico (cellulosa, legno, edera e leccio) il tempo di decomposizione, la temperatura e il tipo di materiale organico in mescolanza erano i fattori in analisi. I dati di perdita di peso sono stati trasformati (logaritmo) al fine di soddisfare l’assunto che i dati siano distribuiti normalmente.

2.3. Risultati

2.3.1. Caratterizzazione chimica dei substrati organici

La lettiera di edera, rispetto a quella di leccio, è risultata più ricca di azoto e carbonio labile ed al contempo più povera lignina. Il contenuto di cellulosa risulta simile nelle due lettiere. Conseguentemente, sia il rapporto C/N che lignina/N risultano decisamente inferiori nella lettiera di edera rispetto a quella di leccio (Tabella 2.7).

La caratterizzazione delle tipologie di carbonio organico mediante la spettrometria ^{13}C-CPMAS NMR ha mostrato evidenti differenze fra le lettiere non decomposte (Tabella 2.7). In particolare, la lettiera di edera è risultata più ricca di C alifatici, C carbossilici e di carboidrati (*O*-alchilici) ma, al contempo, più povera di C metossilici, aromatici e fenolici. Tali differenze risultano evidente anche dall'analisi degli spettri dei quattro materiali organici (Fig. 2.5).

	Lettiere	
	Hedera helix	*Quercus ilex*
Parametri chimici elementari		
C labile(%)	70.4 a	58.5 b
Cellulosa (%)	23.6 a	22.7 a
Lignina (%)	5.7 b	18.3 a
N (%)	2.0 a	1.3 b
C (%)	45.1 a	40.3 a
Rapporto C / N	22.6 b	29.0 a
Rapporto Lignina / N	2.8 b	13.2 a
^{13}C-CPMAS NMR		
C carbossilici: 161-190 p.p.m. (%)	6.8 a	4.4 b
C fenolici: 141-160 p.p.m (%)	2.3 b	5.0 a
C aromatici: 111-140 p.p.m. (%)	6.8 a	13.3 a
C di-O-alchilici: 91-110 p.p.m. (%)	8.9 b	11.6 a
C O-alchilici: 61-90 p.p.m. (%)	43.1 a	41.0 a
C metossilici: 46-60 p.p.m. (%)	6.8 b	7.1 a
C alifatici e alchilici: 0-45 p.p.m. (%)	25.3 a	17.5 b

Tabella 2.7. Caratterizzazione delle lettiere non decomposte di leccio (*Quercus ilex*) ed edera (*Hedera helix*) mediante analisi chimiche elementari e attraverso spettrometria ^{13}C-CPMAS NMR. I valori sono le medie di 3 campioni. Lettere differenti indicano differenze significative (Duncan test $p < 0.05$).

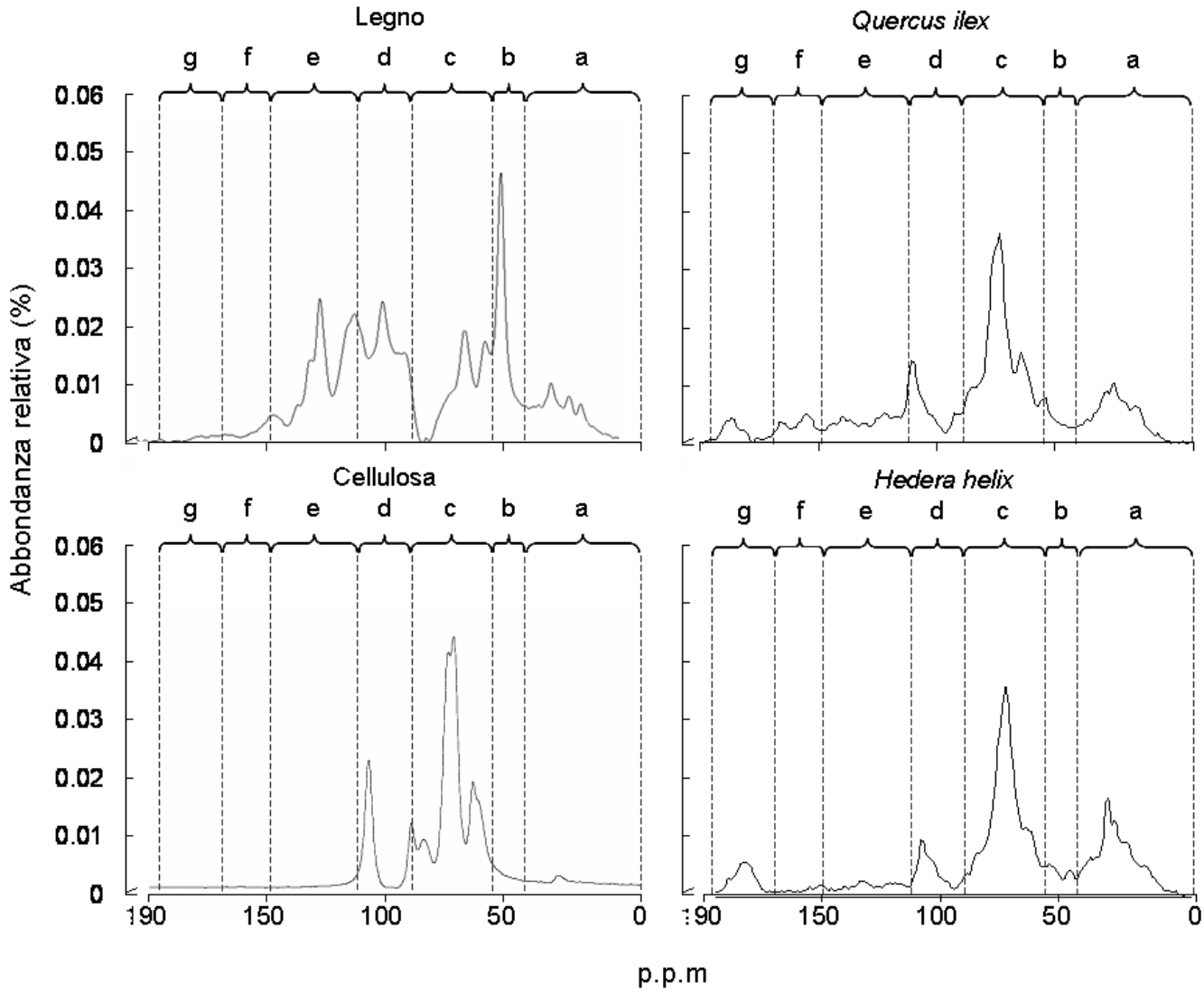

Figura 2.5. Caratterizzazione delle lettiere non decomposte di leccio (*Quercus ilex*), edera (*Hedera helix*) e di frammenti di cellulosa e legno mediante spettrometria ^{13}C-CPMAS NMR. Le linee verticali separano le seguenti regioni dello spettro NMR: a = 0-45; b = 46-60; c = 61-90; d = 91-110; e = 111-140; f = 141-160; g = 161-190. Notare la ridotta abbondanza della regioni alifatica e carbossilica nella cellulosa e nel legno rispetto alle due lettiere.

2.3.2. Diversità microbica e decomposizione

2.3.2.1. Effetto della qualità della lettiera e della temperatura sulla decomposizione

La temperatura, il tipo di materiale organico, la diversità microbica oltre che il tempo di decomposizione sono i fattori sperimentali che hanno mostrato un effetto significativo sulla decomposizione delle matrici organiche (Tabella 2.8). Inoltre, anche tutte le interazioni sono risultate significative ad eccezione della ricchezza di specie per il tempo di decomposizione.

			Modello			Residui				
	R^2 Multiplo	R^2 Aggiust.	SS	gl	MS	SS	gl	MS	F	p
Perdita di peso (%)	0.95	0.91	274027	45	6089	25414	1781	14.2	426.7	**<0.000**

	SS	Gradi L.	MS	F	P
Temperatura	3403.7	1	3403.7	186.0	**<0.000**
Ricchezza di specie	278.5	4	69.6	3.8	**0.004**
Substrato	19597.4	3	6532.4	357.1	**<0.000**
Tempo di decomposizione	13382.1	1	13382.1	731.6	**<0.000**
Temp x ricchezza	354.8	4	88.7	4.8	**<0.000**
Temp * substrato	23699.7	3	7899.9	431.9	**<0.000**
Ricchezza * substrato	3339.7	12	278.3	15.2	**<0.000**
Temp * tempo	973.2	1	973.2	53.2	**<0.000**
Ricchezza * tempo	35.6	4	8.9	0.4	0.745
Substrato * tempo	24023.4	3	8007.8	437.8	**<0.000**

Tabella 2.9. Risultati dell'analisi statistica GLM (modelli lineari generalizzati) per la valutazione degli effetti principali e di interazione esercitati sulla dinamica di decomposizione (perdita di peso, espressa in percentuale rispetto al controllo) dalla temperatura (2 livelli: 12°C e 24°C), dalla ricchezza specifica dell'inoculo microbico (5 livelli: 1, 2, 8, 32 e 64 specie di batteri e funghi), dal tipo di substrato (4 livelli: cellulosa, lignina, foglie di leccio, e foglie di edera) e dalla durata del periodo di decomposizione (variabile continua).

Per quanto riguarda il tipo di materiale organico, la velocità di decomposizione è stata più rapida per l'edera, intermedia per il leccio e molto bassa per i frammenti di cellulosa e il legno (Fig. 2.6). Le due lettiere (edera e leccio) hanno mostrato una dinamica esponenziale negativa della perdita di peso nel tempo. Le differenze nella qualità dei materiali organici sono alla base delle differenze osservate. In particolare, l'edera rispetto al leccio ha un basso rapporto C/N e lignina/N e un maggior contenuto di azoto. La cellulosa e il legno d'altro canto hanno un contenuto di nutriti molto basso e il legno, inoltre, un elevato contenuto di lignina.

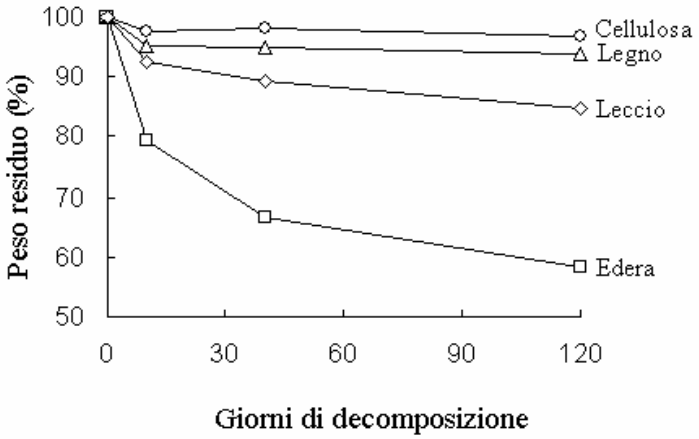

Figura 2.6. Perdita di peso durante 120 giorni di decomposizione delle quattro matrici organiche. I dati sono le medie di tutti i consorzi microbici (n=4,632) alle due temperature (12°C e 24°C).

La temperatura si è rivelato un fattore determinante nella decomposizione delle matrici organiche da parte dei consorzi microbici (Tabella 2.9). Tutti i materiali organici hanno mostrato una perdita di peso più rapida a 24°C rispetto che a 12°C. E' importante però notare che il Q10 tende ad aumentare con la qualità della sostanza organica, quindi risulta minimo per cellulosa e legno e massimo per edera (Fig. 2.7). Inoltre, il Q10 tende a

diminuire per l'edera man mano che il processo di decomposizione procede e quindi la qualità della sostanza organica decade (Q10 di 1.95, 1.79 e 1.68 dopo 10, 40 e 120 giorni di decomposizione, rispettivamente). La maggior reattività della sostanza organica più decomponibile alla temperatura è opposto rispetto ai risultati ottenuti da precedenti studi (es. Fierer et al. 2005; Hartley & Ineson 2008)

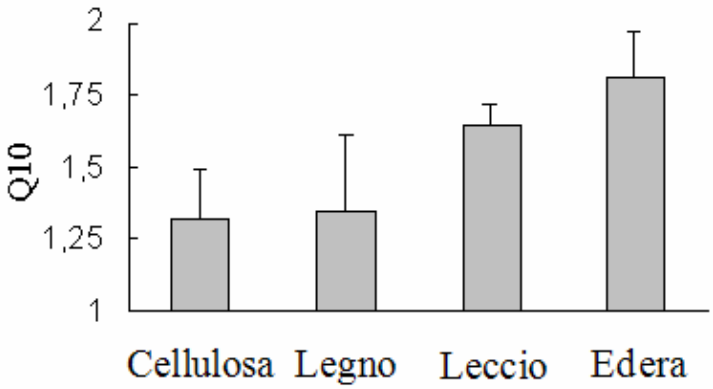

Figura 2.7. Effetto della temperatura sulla decomposizione espresso come coefficiente termico (Q10). I valori sono la media ± deviazione standard. Notare come il Q10 sia più elevato per le due lettiere che hanno mostrato tassi di decomposizione più elevati.

2.3.2.2. Effetto della diversità microbica fungina sulla decomposizione

L'effetto della diversità dei consorzi fungini sulla perdita di peso è stato significativo per le lettiere di edera e di leccio (Tabella 2.9) Al contrario, non è stato alcun effetto significativo per il legno e per la cellulosa (dati non mostrati). Per quanto riguarda le lettiere, l'effetto della diversità microbica fungina è stato più marcato a 24°C rispetto alla temperatura inferiore di 12°C (Fig. 2.8). In particolare per la lettiera di edera, un aumento del numero di specie fungine dei consorzi microbici comporta un incremento della perdita di peso dopo 10, 40 e 120 giorni di decomposizione. In altre

parole, per edera si osserva sempre una relazione positiva tra diversità dei

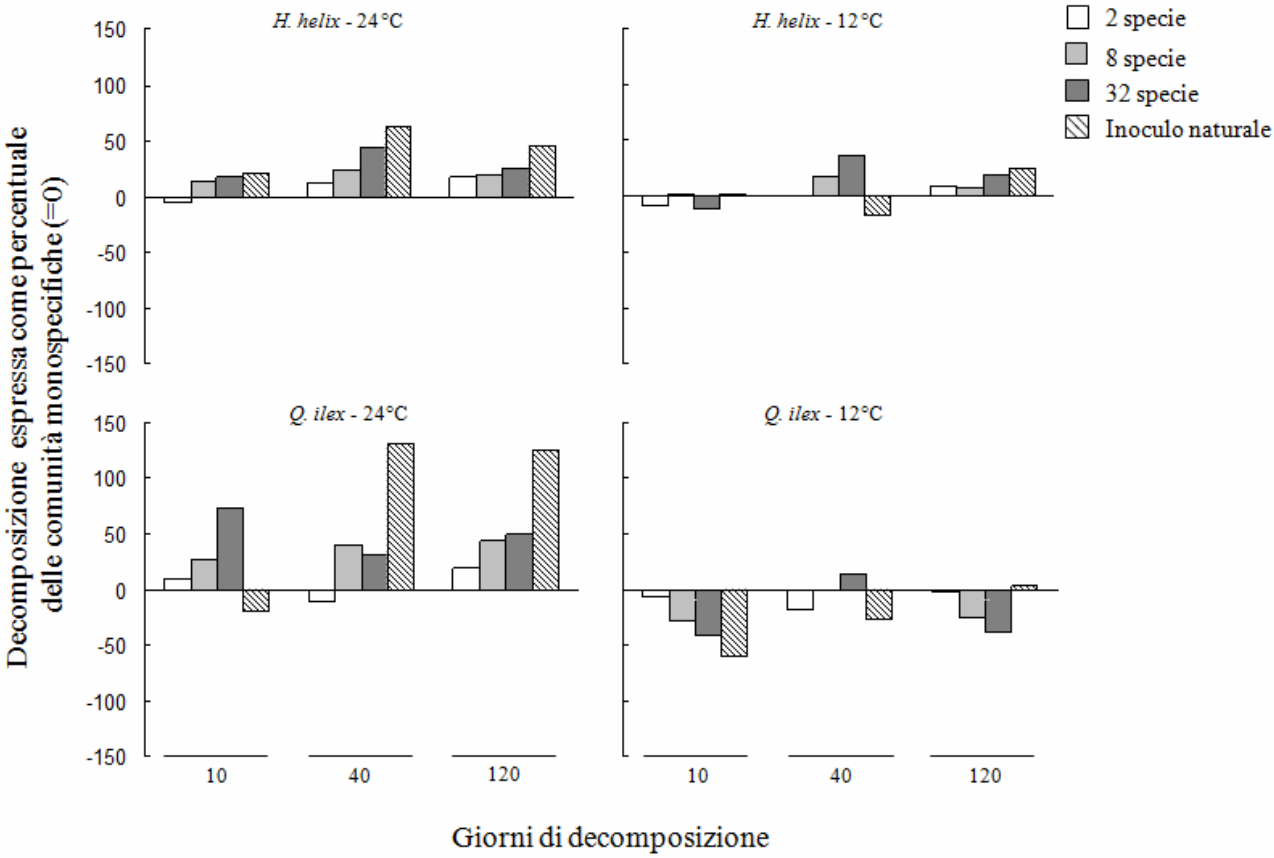

Figura 2.8. Effetto della diversità microbica dei consorzi fungini a due diverse temperature sulla decomposizione delle lettiere di edera e di leccio. I valori sono espressi come percentuale rispetto al livello di decomposizione delle monocolture. Notare come la decomposizione rilevata in presenza di inoculo naturale sia frequentemente maggiore rispetto a tutte le comunità microbiche sintetiche.

Interessante è rilevare come la decomposizione delle lettiere determinata dall'inoculo naturale è tendenzialmente superiore rispetto a tutte le comunità sintetiche. Questa risultato tende ad aumentare col tempo di decomposizione (Fig. 2.8). Alla temperatura bassa l'effetto della diversità risulta meno marcato, diventando apprezzabile solo dopo 40 e 120 giorni di decomposizione (Fig. 2.9).

Anche per il leccio a 24°C il numero di specie dei consorzi è correlato positivamente al calo peso della lettiera (Fig. 2.8 e 2.9). Inoltre il livello di decomposizione indotto dell'inoculo naturale è superiore a tutte le

comunità sintetiche (Fig. 2.8). Al contrario, a 12°C, la relazione tra diversità dei consorzi fungini e decomposizione del leccio è variabile. Alla temperatura più bassa, la ricchezza di specie ha un effetto positivo significativo solo sul calo peso della lettiera di edera dopo 40 e 120 giorni di decomposizione (Fig. 2.8 e 2.9). Per la lettiera di leccio, la relazione tra numero di specie e calo peso della lettiera è positiva a 24°C, e negativa o nulla a 12°C (Fig. 2.7 e 2.8). Infine, è stato rilevato che in 8 casi su 12 il valore della decomposizione indotta delle migliori monoculture fungine è superiore rispetto a quella rilevata con i migliori consorzi sintetici (Fig. 2.8). Il livello di contaminazione delle comunità sintetiche fungine è stato molto basso (0.6%).

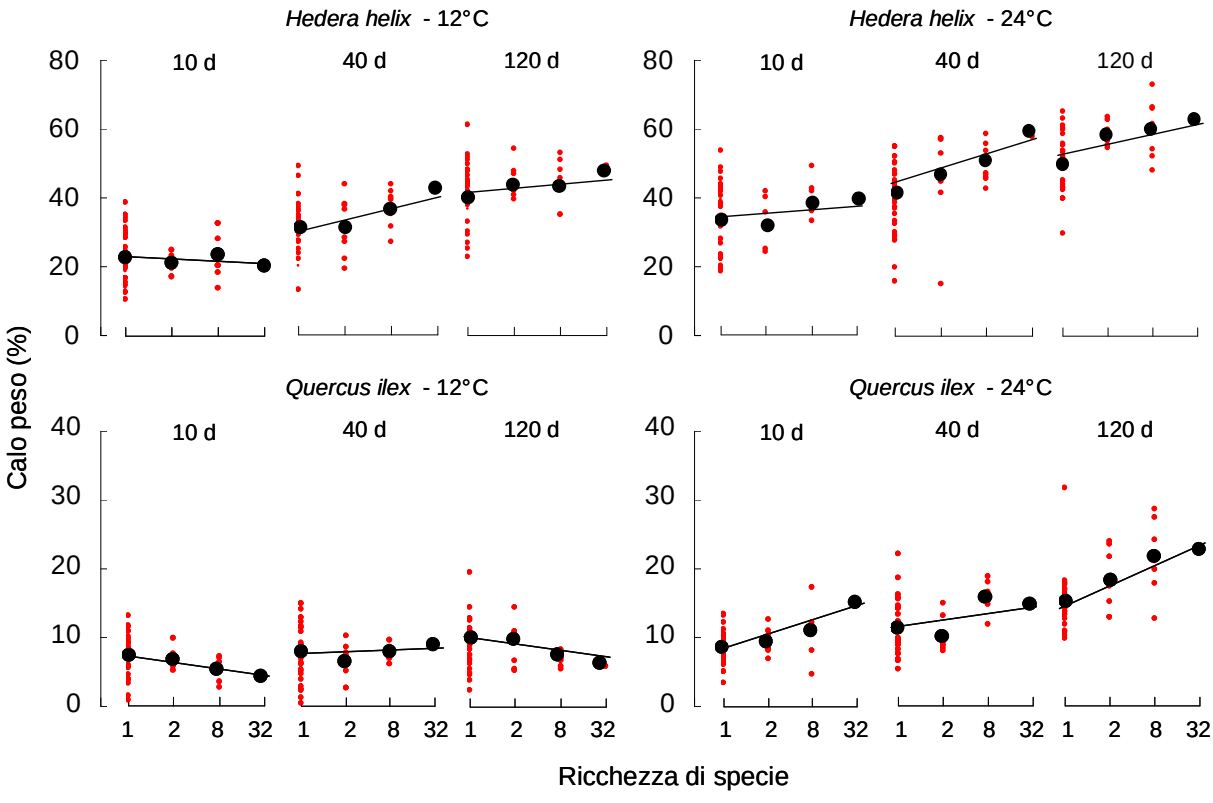

Figura 2.9. Relazione tra ricchezza di specie delle comunità sintetiche fungine e calo peso della lettiera durante i 120 giorni di decomposizione di leccio e edera a due temperature. I punti rossi rappresentano il calo peso indotto da ciascuna comunità microbica, mentre i punti neri sono le medie ad ogni livello di diversità. Le linee di tendenza sono regressioni lineari tra diversità microbica e calo peso della lettiere.

2.3.2.3. Effetto della diversità microbica batterica sulla decomposizione

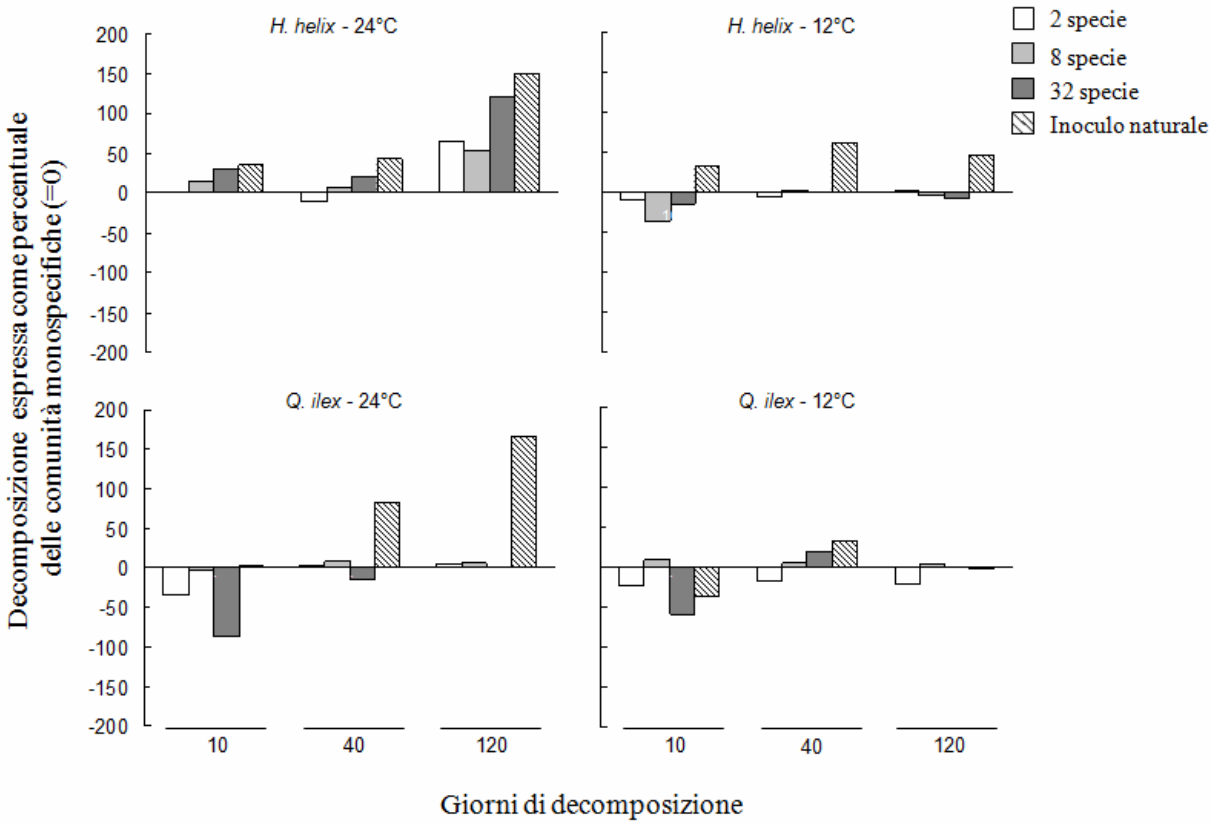

Figura 2.10. Effetto della diversità microbica dei consorzi batterici e della temperatura sulla decomposizione delle lettiere di edera e leccio. I valori sono espressi come percentuale rispetto al livello di decomposizione delle monocolture.

Le diversità delle comunità sintetiche batteriche non ha mostrato nessun effetto significativo sul calo peso del legno e della cellulosa, indipendentemente dalla temperatura (dati non mostrati). Al contrario, l'effetto della diversità batterica sul calo peso delle due lettiere fogliari era influenzato dalla temperatura (Fig. 2.10 e 2.11). Solo per l'edera alla temperatura alta è stata rilevata una forte relazione positiva tra numero di specie batteriche e decomposizione della lettiera (Fig. 2.10 e 2.11). Al contrario, a 12 °C la decomposizione dell'edera non è stata influenzata dalla ricchezza di specie dei consorzi (Fig. 2.11). Con il procedere del tempo di decomposizione e con l'aumento della temperatura tende ad aumentare anche la differenza tra decomposizione indotta dall'inoculo naturale rispetto

a quella dei consorzi sintetici (Fig. 2.10). Per la lettiera di leccio dopo 10 giorni di decomposizione a 24°C è stato notato un effetto negativo molto pronunciato in corrispondenza dei consorzi composti da 32 specie batteriche. La ricchezza di specie batteriche ha mostrato un effetto negativo sul calo peso del leccio in relazione al tempo di decomposizione. In dettaglio, l'effetto era negativo dopo 10 giorni, non significativo dopo 40 giorni e 120 giorni di decomposizione a 12°C (Fig. 2.11).

Infine è interessante rilevare che il livello di contaminazione delle comunità sintetiche batteriche è stato molto elevato a 24°C dopo 120 giorni di decomposizione sia per la lettiera di leccio (35%) che di edera (43%).

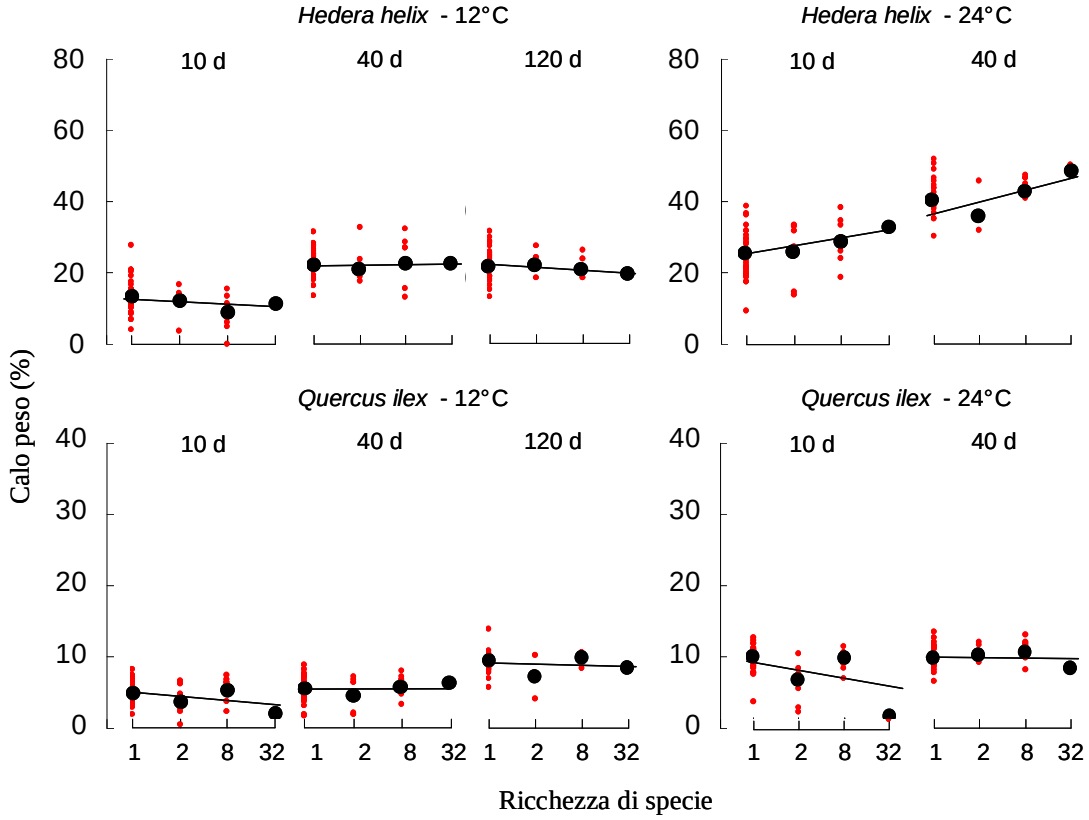

Figura 2.11. Relazione tra ricchezza di specie delle comunità sintetiche batteriche e calo peso della lettiera durante i 120 giorni di decomposizione di leccio e edera a due temperature. I punti rossi rappresentano il calo peso indotto da ciascuna comunità microbica, mentre i punti neri sono le medie ad ogni livello di diversità. Le linee di tendenza sono regressioni lineari tra diversità microbica e calo peso della lettiere. I dati di entrambe le lettiere a 24°C dopo 120 giorni di decomposizione non sono riportati in quanto i microcosmi avevano subito un rilevante livello di contaminazione.

2.3.2.4. Effetto della diversità di comunità sintetiche composte da funghi e batteri sulla decomposizione

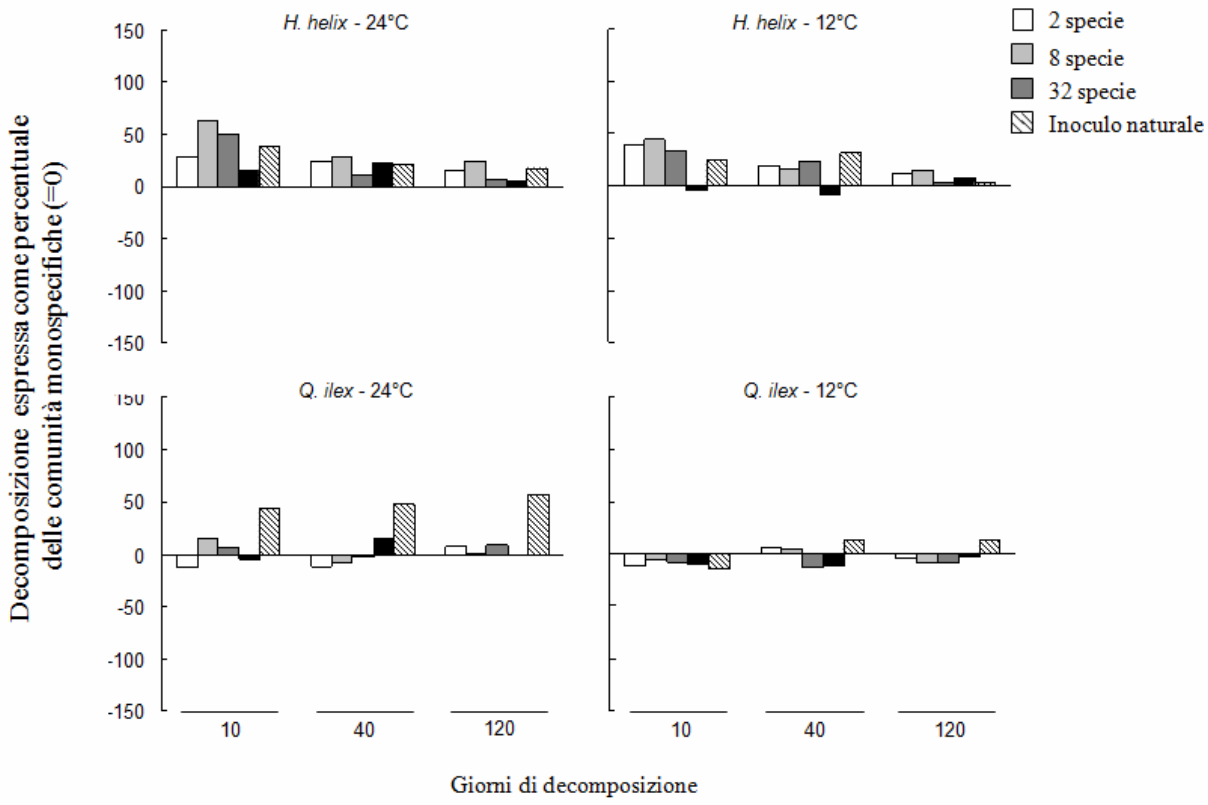

Figura 2.12. Effetto della diversità microbica dei consorzi misti di funghi e batteri della temperatura sulla decomposizione delle lettiere di edera e leccio. I valori sono espressi come percentuale rispetto al livello di decomposizione delle monocolture.

Quando i batteri e i funghi erano inoculati contemporaneamente, l'effetto della diversità sul calo peso dei substrati erano dipendente dal tipo di lettiera oltre che dalla temperature (Tabella 2.9). La diversità ha mostrato un forte effetto positivo sul calo peso dell'edera alla temperatura di 24°C. Per edera in alcuni casi è stata rilavata una relazione fra diversità di specie e decomposizione di tipo unimodale (Fig. 2.12). Infatti, il calo peso era maggiore per le comunità con 2 e soprattutto 8 specie rispetto a quelle composte da 32 e 64 specie microbiche (Fig. 2.12 e 2.13). La perdita di peso del leccio a 24°C e 12°C mostrava relazioni non significate o negative con la diversità microbica (Fig. 2.13). Alla temperatura bassa è stata sempre

rilevata una relazione negativa tra diversità e perdita di peso (Fig. 2.13). La ricchezza di specie non aveva nessun effetto significativo sulla perdita di peso dei frammenti di legno e cellulosa indipendentemente dalla temperatura di incubazione (dati non mostrati).

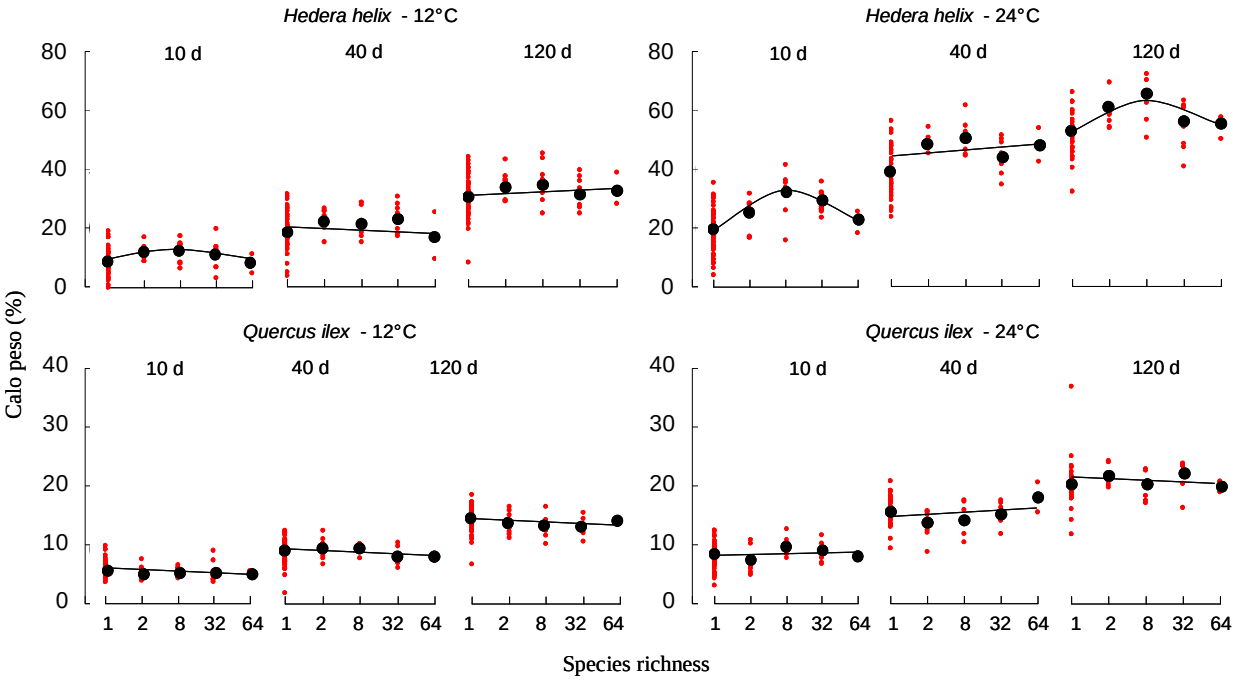

Figura 2.13. Relazione tra ricchezza di specie delle comunità sintetiche di funghi e batteri e calo peso della lettiera durante i 120 giorni di decomposizione di leccio e edera a due temperature. I punti rossi rappresentano il calo peso indotto da ciascuna comunità microbica, mentre i punti neri sono le medie ad ogni livello di diversità. Le linee di tendenza sono regressioni lineari tra diversità microbica e calo peso della lettiere.

2.3.2.5. Diversità microbica e stabilità della decomposizione

La variabilità del processo di decomposizione, espresso come coefficiente di variabilità (i.e. rapporto tra deviazione standard e media), ha mostrato una riduzione con l'aumentare del numero di specie dei consorzi microbici fungini e composti da funghi e batteri contemporaneamente (Fig. 2.14). Al contrario, per le comunità microbiche composte da soli batteri questa relazione negativa non è stata osservata perché il massimo coefficiente si

variabilità è stato rilevato con le comunità composte da due specie (Fig. 2.14).

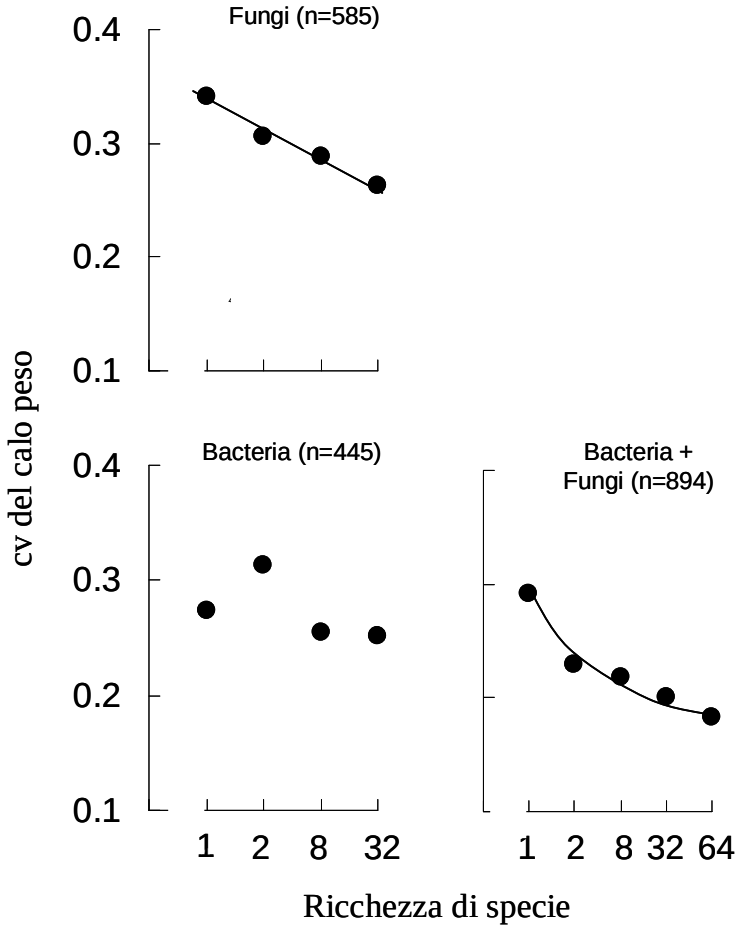

Figura 2.14. Stabilità del processo di decomposizione espressa come coefficiente di variabilità. Il coefficiente di variabilità è stato calcolato per tutte le comunità sintetiche entro ogni livello di ricchezza di specie. Notare la diminuzione del coefficiente di variabilità con l'aumento della ricchezza di specie nel caso di comunità composte da soli funghi o da funghi e batteri contemporaneamente.

2.3.2. Esperimento di decomposizione di lettiere miste

Sia la temperatura che la qualità della lettiera hanno influito in maniera altamente significativa sulla decomposizione delle quattro matrici organiche (Tabella 2.10). In particolare, tutti i substrati a 24°C hanno subito un calo peso significativamente maggiore rispetto a 12°C, ma l'effetto è stato più marcato per le due lettiere fogliari. Per quanto riguarda l'effetto della qualità della lettiera, la decomposizione dell'edera è risultata la più veloce mentre quella della cellulosa e del legno la più lenta. Il seguente ordine decrescente di velocità di decomposizione è stato osservato: *H.* helix > *Q. ilex* > legno ~ cellulosa (Fig. 2.15 e 2.16). Passando alle interazioni tra i materiali organici, la decomposizione delle lettiere di leccio ed edera non è stata influenzata, ad entrambe le temperature, dalla presenza delle altre matrici organiche in mescolanza (Tabella 2.10). In altre parole, leccio ed edera decompongono alla stessa velocità indipendentemente dal materiale organico utilizzato nella combinazione (Fig. 2.15 e 2.16).

	Hedera helix			*Quercus ilex*		
	Gradi di libertà	F	p	Gradi di libertà	F	p
Mescolanza (1)	2	0.98	0.379	2	2.39	0.075
Tempo di decomposizione (2)	4	235.52	< **0.001**	4	282.97	< **0.000**
Temperatura (3)	1	262.57	< **0.001**	1	170.13	< **0.000**
Interazione 1 x 2	8	1.06	0.397	8	0.74	0.707
Interazione 1 x 3	2	6.65	**0.002**	2	1.83	0.148
Interazione 2 x 3	4	14.11	< **0.001**	4	7.26	< **0.000**
Interazione 1 x 2 x 3	8	2.62	**0.013**	8	2.95	**0.002**
	Cellulosa			Legno		
	Gradi di libertà	F	p	Gradi di libertà	F	p
Mescolanza (1)	2	99.07	< **0.000**	2	89.11	< **0.000**
Tempo di decomposizione (2)	4	81.69	< **0.000**	4	102.92	< **0.000**
Temperatura (3)	1	109.86	< **0.000**	1	106.08	< **0.000**
Interazione 1 x 2	8	20.46	< **0.000**	8	21.43	< **0.000**
Interazione 1 x 3	2	33.86	< **0.000**	2	19.63	< **0.000**
Interazione 2 x 3	4	11.50	< **0.000**	4	14.02	< **0.000**
Interazione 1 x 2 x 3	8	5.27	< **0.000**	8	3.64	< **0.000**

Tabella 2.10. Schema sintetico delle quattro analisi ANOVA a tre vie effettuate per i quattro materiali organici utilizzati nell'esperimento di decomposizione di lettiere miste. I valori di p in grassetto indicano che il fattore o l'interazione hanno un effetto significativo sulla perdita di peso delle lettiere.

Al contrario, la decomposizione per il legno e per la cellulosa è stata influenzata in maniera significativa dal tipo di materiale organico con cui erano combinate (Tabella 2.10). Inoltre, tutte le interazioni fra i fattori sperimentali sono risultate significative (Tabella 2.10). I frammenti di legno perdevano lo stesso peso se accoppiati con pezzi di legno o cellulosa (Fig. 2.16). Lo stesso comportamento è stato osservato per i frammenti di cellulosa (Fig. 2.15).

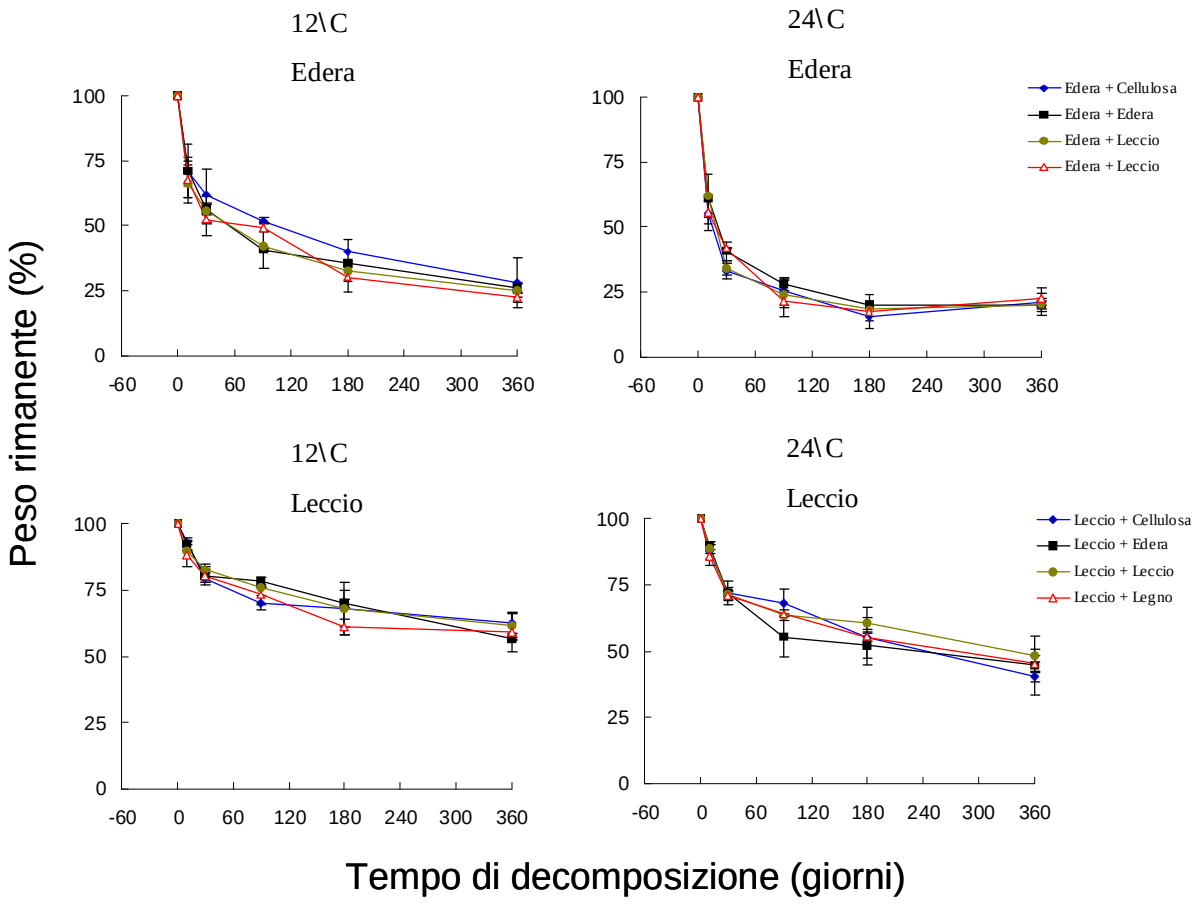

Figura 2.15. Peso rimanente (%) di frammenti di foglie di edera e leccio in presenza di foglie di edera, leccio, cellulosa o legno durante 360 giorni di decomposizione. I valori sono la media ± deviazione standard. Notare che la perdita di peso di entrambe le lettiere è influenzata dalla temperatura mentre nessun effetto si rileva in funzione del materiale organico con cui sono in mescolanza.

Al contrario, i frammenti di legno ed i frammenti di cellulosa quando erano accoppiati con la lettiera di leccio o di edera mostravano una decomposizione molto più intensa (Fig. 2.16). L'edera, in particolare, influiva positivamente sulla perdita di peso sia dei frammenti di legno che di cellulosa. Tale interazione sinergica dell'edera e del leccio sulla cellulosa e sui frammenti di legno è risultata statisticamente significativa ad entrambe le temperature di incubazione. L'effetto maggiore è stato comunque osservato alla temperatura più alta (24 °C).

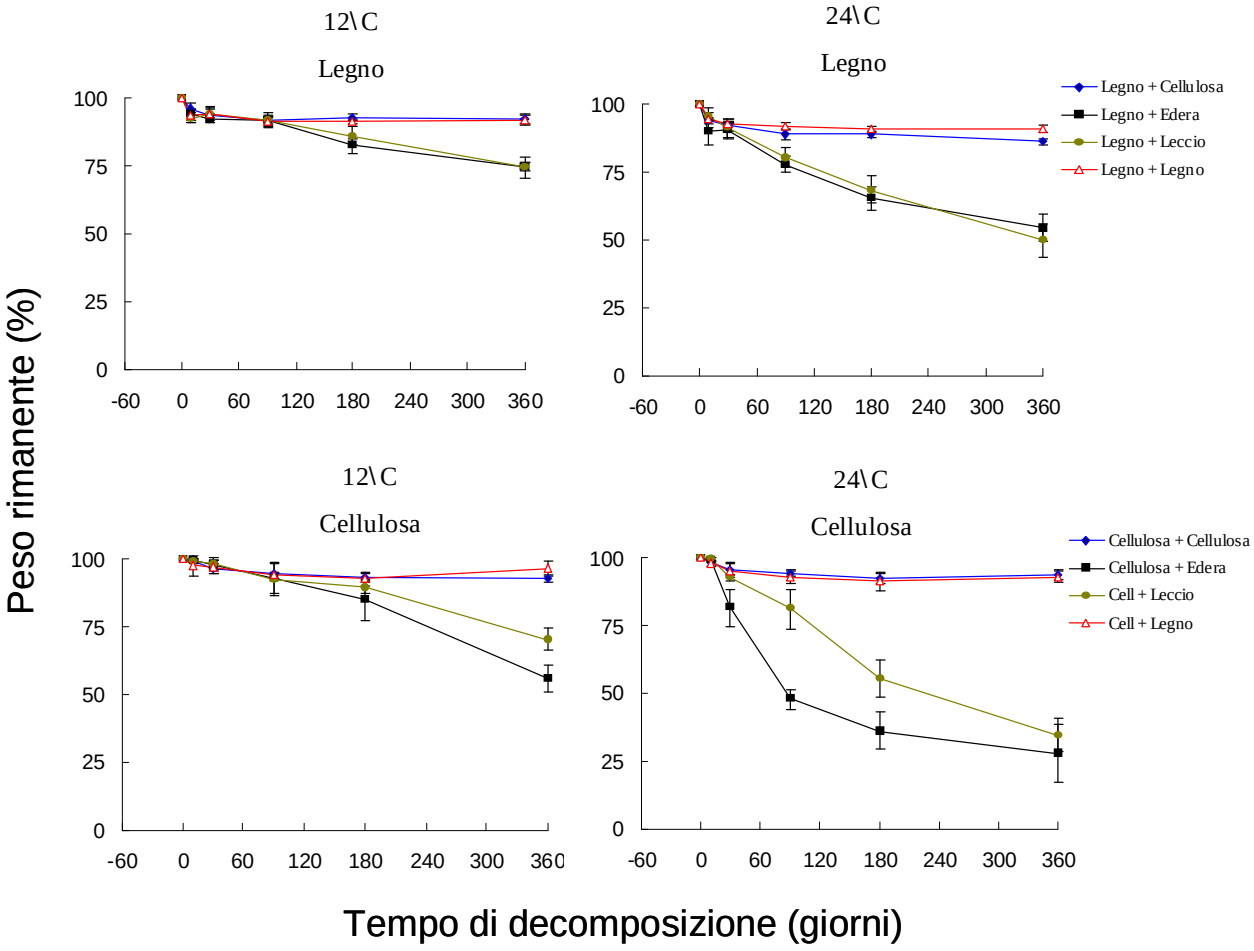

Figura 2.16. Peso rimanente (%) di frammenti di cellulosa e legno in presenza di foglie di edera, leccio, cellulosa o legno durante 360 giorni di decomposizione. I valori sono la media ± deviazione standard. Notare che la perdita di peso di entrambe le lettiere è influenzata dalla temperatura ma soprattutto dalla qualità del materiale organico con cui sono in mescolanza.

2.4 Discussioni

2.4.1. Effetto della diversità microbica sulla decomposizione

Gli esperimenti presenti in letteratura che hanno manipolato il numero di specie all'interno di comunità microbiche sintetiche hanno mostrato un effetto della diversità variabile sulla perdita di peso della sostanza organica, riportando delle relazioni positive, non significative o addirittura negative (Bärlocher & Corkum 2003; Dang et al. 2005; Tiunov & Scheu 2005; Bell et al. 2005; Jiang, L. 2007; Replansky & Bell 2009; Costantini & Rossi 2010). La stessa variabilità scaturisce dai risultati di questo lavoro che rivelano come, modificando la qualità della lettiera e la temperatura, l'effetto della biodiversità sulla funzione ecosistemica vari notevolmente. Questa elevata variabilità nella relazione tra diversità microbica e perdita di peso della lettiera ha fatto ipotizzare che la decomposizione è un processo più resistente alla perdita di specie microbiche (Dang et al. 2005) rispetto alla produttività primaria dei vegetali (Tilman et al. 2001; Hooper et al. 2005).

L'effetto della diversità di specie microbiche sulla decomposizione della sostanza organica è influenzato da interazioni sinergiche e competitive tra i microbi (Deacon et al. 2006). Le interazioni sinergiche fra microrganismi sono quelle che possono spiegare le relazioni positive osservate tra diversità microbica e decomposizione. Tali sinergismi possono emergere quando la nicchia ecologica dei microrganismi è differenziata e quindi complementare. Ad esempio, per i funghi la differenziazione spaziale e temporale della nicchia può verificarsi quando i microbi colonizzano differenti microhabitat (es. utilizzo del lembo fogliare *vs* le nervature) della lettiera oppure durante la decomposizione (specie a strategia r *vs* K), come frequentemente avviene nelle successioni ecologiche a causa di cambiamenti nella qualità della lettiera (Frankland 1992; Osono

& Takeda 2001; Incerti et al. 2011b). Per esempio, alcuni funghi saprofiti che proliferano quando gli zuccheri semplici, ma che non riescono a decomporre composti più complessi del carbonio (es. cellulosa e lignina), possono essere ritrovati su substrati organici recalcitranti perché utilizzano i prodotti del metabolismo di funghi ligninolitici (Dix & Webster 1995). Ovviamente, se tali interazioni si instaurano durante la decomposizione della lettiera risulta probabile che consorzi microbici costituiti da specie con nicchia ecologica complementare possano essere più efficienti rispetto a colture monospecifiche (Brenner et al. 2008). Al contrario, la decomposizione della lettiera può essere ritardata in presenza di consorzi multispecifici rispetto alle monoculture quando i microrganismi competono per le risorse e lo spazio. Questo può avvenire quando i microrganismi rilasciano composti con attività antimicrobica che influenzano negativamente le specie con una maggiore capacità saprofitaria.

In questo lavoro, sia le interazioni microbiche competitive che quelle sinergiche potrebbero spiegare la decomposizione rallentata e/o accelerata indotta dai consorzi microbici costituiti da più specie rispetto a quanto osservato nelle monocolture. E' interessante notare come la presenza singola o contemporanea di gruppi funzionali microbici (batteri *vs* funghi) sembra svolgere un ruolo importante nel determinare la relazione tra diversità e decomposizione microbica. L'effetto della diversità microbica sulla decomposizione è risultato differente quando i funghi o i batteri erano inoculati separatamente, rispetto a quando i due gruppi microbici erano inoculati contemporaneamente. Se consideriamo l'esperimento in cui i funghi sono stati inoculati insieme ai batteri alla temperatura più alta, la diversità microbica ha mostrato un effetto positivo e negativo sulla decomposizione dell'edera e del leccio, rispettivamente. Al contrario, quando i funghi sono stati inoculati da soli la relazione era positiva per entrambe le lettiere. L'effetto antagonistico osservato nei consorzi formati

da funghi e batteri sulla lettiera di leccio potrebbe essere dovuto alla competizione dei batteri, che normalmente hanno capacità saprofitarie minori rispetto ai funghi, e alla bassa qualità chimica della lettiera di leccio. Una possibile spiegazione potrebbe essere che i batteri crescendo rapidamente sottraggono i pochi zuccheri semplici disponibili sulla lettiera di leccio. Conseguentemente, la presenza dei batteri ed eventualmente del loro metaboliti tossici potrebbe inibire la naturale successione ecologica limitando lo sviluppo dei funghi cellulosolitici e ligninolitici. Questi tipi di funghi, infatti, non sono abili colonizzatori ma possiedono un adeguato corredo enzimatico per attaccare e decomporre i substrati organici più recalcitranti. Tale fenomeno di inibizione dei funghi della fase finali delle successioni da parte dei microrganismi colonizzatori è stato più volte descritto in letteratura (Frankland 1998). Ad esempio, la precoce colonizzazione e decomposizione della lettiera da parte dei funghi della fillosfera può ritardare la successione ecologica inibendo i funghi tellurici dotati di maggiori capacità saprofitarie (Osono 2003). Ulteriori esperimenti saranno necessari per indagare questa ipotesi. All'opposto sulla lettiera di edera, materiale ricco di composti del labile del carbonio, inizialmente i funghi ed i batteri sembrano cooperare nel processo di decomposizione. Comunque, è noto che la lettiera vegetale che inizialmente è ricca di composti labili, col procedere della decomposizione diventa progressivamente più recalcitrante alla decomposizione microbica a causa della rapida sottrazione di composti labili e all'aumento relativo di lignina e composti con catene alifatiche (Bonanomi et al. 2011c; Incerti et al. 2011b; Ono et al. 2011). In altre parole, i microbi eterotrofi, utilizzando i substrati organici modificano progressivamente le caratteristiche biochimiche della lettiere (Swift et al., 1979) che a loro volta sono alla base delle successioni microbiche. Nel caso dell'edera, studi precedenti hanno dimostrato che durante la decomposizione la lettiera diventa da altamente decomponibile a

recalcitrante per la progressiva sottrazione selettiva di zuccheri semplici e l'accumulo di composti aromatici ed alifatici (Bonanomi et al. 2011c). In base a tali considerazioni è interessante notare come ad un progressivo calo della qualità della lettiera, corrisponde una progressiva riduzione delle interazioni sinergiche tra i funghi e i batteri nella decomposizione della sostanza organica. Questo suggerisce che quando gli zuccheri sono abbondanti (es. lettiera fresca indecomposta) i batteri e i funghi potrebbero cooperare, o a limite non competere. Comunque, quando le risorse si riducono l'intensità della competizione aumenta e probabilmente la funzionalità dei consorzi microbici misti si riduce. Quando i due gruppi microbici sono stati inoculati separatamente si è verificato il contrario. Cioè nel corso della decomposizione le interazioni positive tra funghi sono rimaste stabili, mentre quelle tra batteri aumentavano. Purtroppo, per ora non siamo in grado di spiegare una spiegazione plausibile per quest'effetto contrastante. Sono indispensabili studi aggiuntivi per chiarire come le interazioni microbiche vengono influenzate dalle variazioni della qualità della lettiera e dalla temperatura, anche tenendo in considerazione che gran parte degli studi precedenti riguardano solo i funghi (e.g. Bärlocher & Corkum 2003; Dang et al. 2005; Costantini & Rossi 2010) o solo i batteri (e.g. Bell et al. 2005; Jiang, L. 2007; Langenheder et al. 2010) e solo uno studio ha indagato la relazione tra diversità microbica e decomposizione utilizzando i due gruppi contemporaneamente (Setälä & McLean 2004). Tale aspetto risulta di grande rilevanza in quanto il processo di decomposizione della sostanza organica e quasi sempre operati dai funghi e dai batteri che coesistono durante tutte le fasi delle successioni microbiche.

Oltre ai gruppi funzionali microbici (batteri *vs* funghi), anche il numero di specie all'interno delle comunità sintetiche sembra svolgere un ruolo nel determinare la forma delle relazione tra diversità e decomposizione. Considerando ad esempio solo le relazioni positive tra

ricchezza di specie e decomposizione, le comunità composte da due e da otto specie hanno spesso mostrato un'efficienza maggiore rispetto alle monoculture ma anche delle comunità più ricche di specie (32 e 64). Come conseguenza la funzione ecosistemica osservata era spesso di tipo unimodale e non lineare positiva come riportato in molti studi (Hooper et al. 2005). Questo risultato è comunque coerente con quanto riportato da Setälä & McLean (2004), dove la massima decomposizione di humus era rilevata con consorzi formati da 4 e 6 specie. Questo suggerisce che esista un'elevata ridondanza funzionale all'interno dei pool microbici coinvolti nella decomposizione della sostanza organica del suolo. In tale contesto è però importante ricordare che le comunità naturali utilizzate nello studio spesso mostravano una capacità di decomposizione decisamente superiore a tutte le comunità sintetiche. In particolare, considerando le lettiere di leccio ed edera alle due temperature e ai tre tempi di decomposizione, nel 61% dei casi (22 su 36) l'inoculo naturale determinava una perdita di peso maggiore rispetto alla migliore comunità sintetica. Ciò suggerisce che nella comunità naturale sono presenti specie e/o si sviluppano combinazioni microbiche più funzionali rispetto a quelle generate a caso da un pool di specie. Un limite dell'approccio sperimentale qui utilizzato è infatti l'impossibilità di includere specie non colturabili all'interno delle comunità sintetiche. Tale limite potrebbe essere superato attraverso l'utilizzo dell'approccio delle diluizioni-estinzioni. Infatti, la maggior parte degli studi presenti in letteratura volti a definire le relazioni tra biodiversità e funzioni ecosistemiche utilizzano solo una limitata frazione della diversità microbica esistente per allestire le comunità sintetiche. Un passo per superare i limiti del nostro approccio (es. le specie non colturabili non possono ovviamente essere incluse) si basa sull'utilizzo dell'estinzione selettiva delle specie (Hannes et al. 2010). Tale approccio permette un'analisi più realistica del possibile impatto della riduzione delle diversità sulla funzionalità delle

comunità microbiche naturali. In questo caso le comunità microbiche selezionate potrebbe essere trattate con il metodo delle diluizioni-estinzioni per generale gradienti di ricchezza specifica. Questo permette di includere non solo le specie colturabili (comunemente l'1-5% delle specie presenti) ma anche quelle non colturabili (van der Heijden et al. 2008). Comunque, anche tale approccio ha dei limiti. In particolare non permette di generale gradienti di diversità in cui il numero di specie sia sotto controllo. Futuri studi potrebbero mettere a confronti i due approcci sperimentali sopra descritti.

Infine, alcune considerazioni possono essere fatta circa i possibili meccanismi alla base delle relazioni tra diversità microbica e funzionalità dei microcosmi. Numerosi studi (review in Hooper et al. 2005) hanno cercato di comprendere se l'effetto delle comunità a maggior diversità sia determinato da un effetto di campionamento, o *sampling effect* (i.e. la maggior probabilità che le comunità miste contengano le specie più performanti) o da una reale complementarietà tra le specie in interazione (*niche complementarity*). Un metodo semplice per testare le due ipotesi è comparare le miglior policolture con le migliori monocolture. Se le migliori monocolture mostrano delle proprietà uguali o superiori alle migliori comunità miste, probabilmente il *sampling effect* è alla base dei risultati osservati (Huston 1997). Al contrario, se le migliori comunità miste mostrano delle proprietà superiori alle migliori monocolture allora il risultato è probabilmente ascrivibile ad una complementarietà funzionale tra le specie presenti nei consorzi. Comparando le figure 2.9, 2.11 e 2.13 si evince che dei 34 casi sperimentali complessivi solo in 6 casi (17.5%) le migliori comunità miste mostravano delle prestazioni superiori alle migliori monocolture. Ciò suggerisce che la complementarietà funzionale tra specie in alcuni casi esiste, ma che il *sampling effect* sembra essere il fattore

predominante nel determinare le relazioni positive tra decomposizione e diversità microbica.

L'ultimo risultato meritevole di discussione è relativo alla relazione tra diversità microbica e stabilità delle funzioni ecosistemiche. Questo argomento è stato oggetto di un acceso dibattito negli ultimi anni (McCann 2000) ed il presente studio apporta un interessante contributo. I nostri risultati hanno mostrato che la variabilità del processo decomposizione della lettiera diminuiva in maniera considerevole con l'aumento del numero di specie all'interno delle comunità sintetiche. In altre parole, le comunità monospecifiche mostravano una'enorme variabilità (i.e. erano presenti cioè comunità molto efficienti nella decomposizione ed altre invece poco efficienti) mentre le comunità miste mostravano una variabilità via via inferiore con il crescere del numero di specie all'interno dei consorzi. Risultati simili sono stati precedentemente riportati sia per comunità sintetiche composte da soli funghi (Dang et al. 2005; Tiunov et al. 2005), da soli batteri (Bell et al. 2005) o da piante terrestri (Tilman 1999). La ridotta variabilità nel livello di decomposizione nelle comunità più ricche di specie può essere messa in relazione ad un semplice effetto matematico, in quanto le comunità miste hanno forzatamente proprietà che sono la media delle componenti singole (Lecerf et al. 2007; Keith et al. 2008). Questo potrebbe sembrare un aspetto triviale della discussione in quanto sembra ovvio che delle mescolanze di elementi abbiano proprietà intermedie rispetto agli elementi che la compongono. Comunque, questo effetto può avere conseguenze ecosistemiche rilevanti. Infatti la dominanza di una comunità di una o poco specie molto performanti in alcune condizioni può determinare il completo tracollo del sistema appena le condizioni ecologiche vengono a mutare (Tilman 1999). Al contrario, un sistema composto da elementi differenti e complementari come esigenze ecologiche è maggiormente capace di mantenere stabile la funzione al mutare delle

condizioni. Tale fenomeno è anche detto *portfolio effect* (Tilman 1999) in quanto è simile a quanto avviene in economica dove investimenti differenziati sono più sicuri rispetto a quelli specifici. Questo è esattamente quanto osservato nei nostri esperimenti, dove le comunità miste erano più stabili rispetto alle monocolture al variare della qualità della sostanza organica e delle temperature di incubazione.

2.4.2. Effetto della diversità della lettiera sulla decomposizione

Le relazioni tra biodiversità e decomposizione della materia organica sono meno note in quanto poco studiate rispetto alla produttività primaria (Berg & McClaugherty, 2008). Infatti, la maggior parte degli studi sulla decomposizione sono stati effettuati sulla lettiera di singole specie, e sebbene i loro risultati hanno migliorato le conoscenze sugli effetti del clima, della qualità della lettiera, degli organismi decompositori, dei fattori edafici e del riscaldamento globale, tralasciando però il ruolo della diversità vegetale su tale processo. Comunque, tra la fine degli anni sessanta e la metà degli anni ottanta, alcuni ricercatori avessero suggerito la possibilità di interazioni tra le lettiere (Thomas 1968; Staaf 1980; Seastedt 1984) con importanti riflessi sulla decomposizione ed il ciclo dei nutrienti rispetto alle lettiere delle singole specie. Un ulteriore effetto della diversità della lettiera è sulla struttura, diversità e funzionalità della comunità edafica (batteri, funghi e pedofauna), che a sua volta svolge un ruolo fondamentale nella decomposizione della sostanza organica e quindi nel riciclo dei nutrienti. In generale, l'effetto di lettiere miste rispetto a quelle monospecifiche sui tassi di decomposizione e sulla comunità edafica possono essere negativi (interazioni antagoniste; Bonanomi et al., 2010), positivi (interazioni sinergiche; Kaneko e Salamanca, 1999) o nulli (interazioni additive; Migge et al. 1998) e possono dipendere da numerosi fattori. Tra questi fattori, il trasferimento di nutrienti e metaboliti secondari tra i tipi di lettiera

componenti la miscela attraverso la lisciviazione (Fyles & Fyles, 1993; Briones & Ineson 1996) oppure mediata dai funghi (McTiernan et al. 1997) è sicuramente uno dei più importanti. In particolare, i nutrienti liberatisi da una lettiera di migliore qualità chimica possono aumentare la degradazione di una lettiera adiacente più recalcitrante, mentre il rilascio di composti inibitori come fenoli e tannini può rallentare la decomposizione della lettiera adiacente (Salamanca et al. 1998). Inoltre, un ulteriore fattore può essere la differente capacità di trattenere l'acqua della lettiera mista (Hansen 1999), o la formazione di un maggior numero di microhabitat e/o cambiamenti della struttura fisica dello strato di lettiera per i microartropodi (Hansen & Coleman, 1998).

Nella revisione più completa della letteratura (Gartner & Cardon 2004) circa il ~50%, ~30% e ~20% degli studi hanno riportato interazioni tra lettiere di tipo sinergico, additivo e antagonistico, rispettivamente. Nel nostro esperimento la maggioranza delle interazioni tra lettiere (60%) sono di tipo additivo e nel rimanente 40% di tipo sinergico. Coerentemente con i risultati ottenuti da precedenti studi (Wardle et al. 2006; Lecerf et al. 2007), il nostro studio ha mostrato che la qualità del materiale organico è un fattore determinante la velocità del processo di decomposizione e il risultato dell'interazione fra i materiali. Un incremento del tasso di decomposizione in mescolanza può essere determinato da un efficiente trasferimento dei nutrienti tra i diversi materiali organici oppure alla formazione di un habitat a maggior complessità strutturale e chimica che è in grado di ospitare una maggior diversità microbica. In tale contesto alcuni autori (Seastedt 1984; Chapman et al. 1988) hanno suggerito che la presenza in mescolanza di lettiere con elevata qualità chimica (basso rapporto C/N e lignina/N, alta concentrazione di N) può aumentare il tasso di decomposizione di materiali organici con minor qualità chimica. Ad esempio Wardle et al. (1997) ha dimostrato che la probabilità di rilevare effetti non additivi in mescolanze di

lettiere aumenta con la diversità chimica delle lettiere stesse. Un recente studio condotto con specie mediterranee (Bonanomi et al. 2010) ha supportato tali evidenze, in quanto mescolanze di lettiere con caratteristiche contrastanti mostravano interazioni di tipo sinergico o antagonistico. I risultati ottenuti in questo studio sono coerenti con quanto sopra descritto. Infatti, le mescolanze costituite da lettiere delle stesse specie o da materiali chimicamente simili mostravano sempre interazioni additive. Al contrario, le mescolanze di lettiere con caratteri fortemente contrastanti (le due lettiere in mescolanza con la cellulosa o con il legno) mostravano sempre interazioni fortemente sinergiche. In questi casi risulta molto probabile che il sinergismo sia determinato dal trasferimento di nutrienti, ed in particolare di N, fra le lettiere ed il legno o la cellulosa che ne sono estremamente povere. Al momento non sono disponibili dati a supporto di tale ipotesi, ma attualmente sono in corso nel nostro laboratorio analisi del contenuto di nutrienti delle lettiere (N, P, S, K^+ e Ca^{++}) nelle diverse mescolanze durante l'intero processo di decomposizione. Tali analisi permetteranno di testare inequivocabilmente l'ipotesi del trasferimento di nutrienti. L'ipotesi del trasferimento di nutrienti tra lettiere mediato dai funghi è indirettamente supportato da osservazioni effettuate durante gli esperimenti. In particolare, già pochi giorni a seguito dell'incubazione delle lettiere era possibile osservare del micelio fungino svilupparsi dalle lettiere più ricche di nutrienti verso i frammenti di cellulosa e legno che venivano cosi ad essere colonizzati. Al contrario, tale fenomeno non si osservava nelle mescolanze contenenti solo cellulosa, legno o i due materiali assieme (Fig. 2.17).

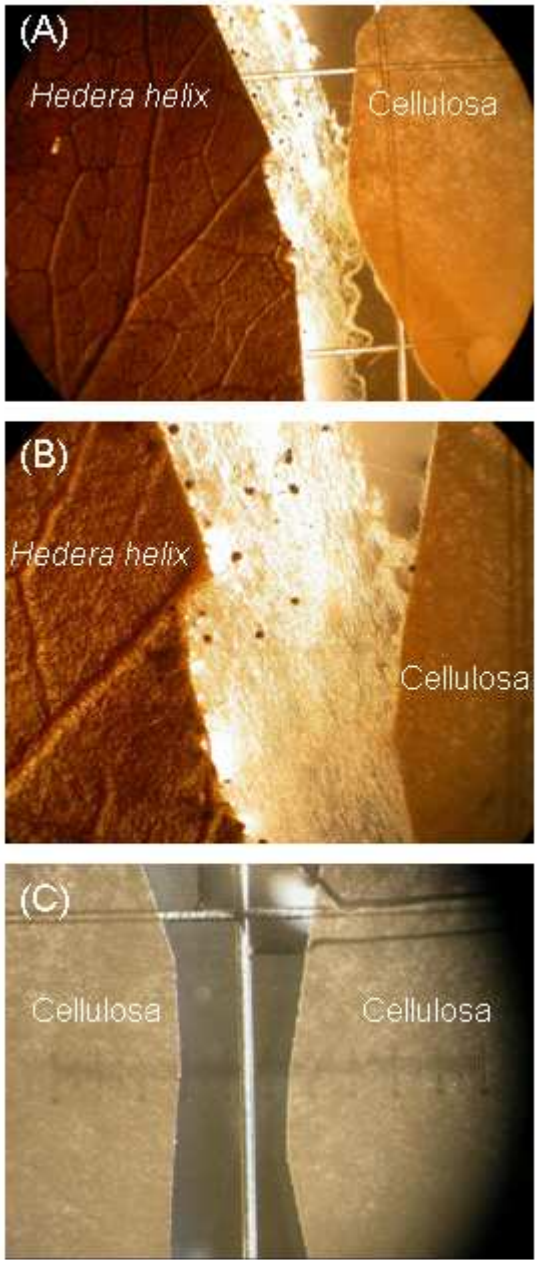

Figura 2.17. Immagini dell'esperimento di decomposizione di lettiera mista 10 giorni dopo l'incubazione. Nelle due immagini superiori è visibile del micelio fungino (*fungal bridge*) che si sviluppa dai frammenti di edera verso i frammenti di cellulosa. Nella foto inferiore, dove sono presenti due frammenti di cellulosa, il micelio non è presente. Risulta quindi possibile che i funghi siano in grado di colonizzare la cellulosa (povera di N) utilizzando i nutrienti presenti nella lettiera di edera ricca di N, K^{+} e Ca^{++} (Bonanomi et al. 2010).

La presenza di micelio fungino che unisce lettiere (*fungal bridge*) di specie differenti è un fenomeno spesso osservato in natura (Fig. 2.18), sebbene il ruolo ecologico non sia ancora chiaro. In tale contesto è interessante rilevare che un recente studio ha dimostrato che l'eliminazione del *fungal bridge* tramite disturbo meccanico può ridurre il tasso di decomposizione della lettiera in condizioni semi-naturali (Chigineva et al. 2011).

Figura 2.18. Immagine del *fungal bridge* in condizioni naturali. In entrambe le immagini il micelio fungino è così sviluppato da unire foglie di specie differenti. Le foto sono relative a lettiera presente su suolo di una forestale tropicale iper umida (Foresta di Sinajara, Sri Lanka; gentile concessione del Dott. Giuliano Bonanomi).

2.5. Referenze citate

Aerts, R., 1997. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79: 439-449.

Almendros, G., Dorado, J., González-Vila, F.J., Blanco, M.J., Lankes, U., 2000. 13C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest shrub biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 793-804.

Bärlocher, F., Corkum, M., 2003. Nutrient enrichment overwhelms diversity effects in leaf decomposition by stream fungi. *Oikos* 101: 247-252.

Bell, T. Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L,, Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436: 1157-1160.

Berg, B., Matzner, E., 1997. The effect of N deposition on the mineralization of C from plant litter and humus. *Environmental Review* 5: 1-25.

Berg, B., McClaugherty, C., 2008 Plant litter. Decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer, Berlin.

Bonanomi, G., Incerti, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Mazzoleni, S., 2010. Decomposition and nutrient dynamics in mixed litter of Mediterranean species. *Plant and Soil* 331: 481-496.

Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A., 2011a. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Applied Soil Ecology* 47:184-194

Bonanomi, G., Incerti, G., Barile, E., Capodilupo, M., Antignani, V., Mingo, A., Lanzotti, V., Scala, F., Mazzoleni, S., 2011c. Phytotoxicity, not nitrogen immobilization, explains plant litter

inhibitory effects: evidence from solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *New Phytologist* 191:1018-1030.

Bonanomi, G., Incerti, G., Giannino, F., Mingo, A., Lanzotti, V., Mazzoleni, S., 2011b. Litter quality assessed by solid state ^{13}C NMR spectroscopy predicts decay rate better than C/N and Lignin/N ratios. *Soil Biology & Biochemistry* Submitted.

Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26: 483-489.

Briones M.J.I., Ineson P., 1996. Decomposition of Eucalyptus leaves in litter mixtures. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 1381-1388.

Chapman, K., Whittaker, J.B., Heal, O.W., 1988. Metabolic and faunal activity in litters of tree mixtures compared with pure stands. *Agriculture Ecosystem & Environment* 24: 33–40.

Chigineva, N.I., Aleksandrova, A.V., Marhan, S., Kandeler, E., Tiunov, A.V., 2011. The importance of mycelial connection at the soil–litter interface for nutrient translocation, enzyme activity and litter decomposition. *Applied Soil Ecology* 51: 35-41.

Costantini, M.L., Rossi, L., 2010. Species diversity and decomposition in laboratory aquatic systems: the role of species interactions. *Freshwater Biology* 55: 2281-2295.

Criquet, S., Ferre E., Farnet, A.M., Le Peti,t J., 2004 Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1111–1118.

Dang, C.K., Chauvet, E., Gessner, M.O., 2005. Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships. *Ecology Letters* 8: 1129-1137.

Deacon, L.J., Pryce-Miller, E.J., Frankland, J.C., Bainbridg, B.W., Moore, P.D., Robinson, C.H., 2006. Diversity and function of

decomposer fungi from a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 7-20.

Deacon, J.W., 1985. Decomposition of filter paper cellulose by thermophilic fungi acting singly, in combination, and in sequence. *Transaction British Mycological Society* 85: 663–669.

Degens, B.P., 1998 Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1989-2000.

Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., Munch, J.C., 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 921-930.

Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., Munch, J.C., 2004. Bacterial diversity in agricultural soils durino litter decomposition. *Applied Environmental Microbiology* 70: 468-474.

Dix, N. J., Webster, J. 1995. Fungal Ecology. Chapman & Hall, London.

Duarte, S., Pascoal C., Cássio, F., Bärlocher, F., 2006. Aquatic hyphomycete diversity and identity affect leaf litter decomposition in microcosms. *Oecologia* 147: 658–666.

Fierer, N., Craine, J.M., McLauchlan, K., Shimel, J.P., 2005. Litter quality and the temperature sensitivity of decomposition. *Ecology* 86: 320–326.

Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 167-176.

Frankland, J.C., 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102: 1-15.

Fyles J.W., Fyles I.H., 1993. Interaction of douglas-fir with red alder and salal foliage litter during laboratory bioassays and field studies. *Biogeochemistry* 12: 43-68.

Garrett, S.D., 1963. Soil Fungi and Soil Fertility. Oxford.

Gartner, T.B., Cardon, Z.G., 2004 Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. *Oikos* 104: 230–246.

Gessner, M.O., 2005. Proximate lignin and cellulose. In: Graca, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O. (Eds), Methods to study litter decomposition. A Practical Guide. Springer Verlag, The Netherlands, pp. 115-120.

Gholz, H.L., Wedin, D.A., Smitherman, S.M., Harmon, M.E., Parton, W.J., 2000. Long-term dynamics of pine and hardwood litter in contrasting environments: toward a global model of decomposition. *Global Change Biology* 6: 751-765.

Gillon, D., Joffre, R., Ibrahima, A., 1999. Can litter decomposability be predicted by near infrared reflectance spectroscopy? *Ecology* 80: 175-186.

Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sorensen, S.J., Bååth, E., Bloem, J., de Ruiter, P.C., Dolfing, J., Nicolardot, B., 2000 Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem functioning relationship. *Oikos* 90: 279-294.

Hannes, P., et al., 2010. Function-specific response to depletion of microbial diversity. *The ISME Journal* 5:doi:10.1038/ismej.2010.119.

Hansen, R.A., 1999. Red oak litter promotes a microarthropod functional growth that accelerates its decomposition. *Plant and Soil* 209: 37-45.

Hansen, R.A., Coleman, D.C., 1998. Litter complexity and composition are determinants of the diversity species composition of orabatid mites (Acari: Oribatida) in litterbags. *Applied Soil Ecology* 9: 17-23.

Hartley, I.P., Ineson, P., 2008. Substrate quality and the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1567–1574.

Hättenschwiler, S., Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005 Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review Ecology Evolution & Systematic* 36: 191–218.

Hooper, D.U., Chapin, F.S. III, Ewel, J.J. et al., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75: 3-35.

Huang, Y, Stankiewicz, B.A., Eglinton, G., Snape, C.E., Evans, B., Latter, P.M., Ineson, P., 1998. Monitoring biomacromolecular degradation of Calluna vulgaris in a 23 year field experiment using solid state ^{13}C-NMR and pyrolysis-GC/MS. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1517-1528.

Hudson, H.J., 1968. The ecology of fungi on plant remains above the soil. *New Phytologist* 67: 837-874.

Huston, M.A., 1997. Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* 110: 449-460.

Incerti, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Lanzotti, V., Termolino, P., Senatore, M., Scala, F., Mazzoleni, S., Bonanomi, G., 2011b. Fungal growth on plant litter explained by biochemical changes assessed with ^{13}C-CPMAS NMR spectroscopy. *Fungal Ecology* Submitted.

Incerti, G., Bonanomi, G., Giannino, F., Piermatteo, D., Castaldi, S., Fioretto, A., Papa, S., De Marco, A., Fierro, A., Maggi, O., Persiani, A.M., Rutigliano, F.A., Feoli, E., Virzo De Santo, A.,

Mazzoleni S., 2011b. Litter decomposition in Mediterranean ecosystems: modelling the controlling role of climatic conditions and litter quality. *Applied Soil Ecology* 49: 148-157.

Jensen, V., 1974. Decomposition of Angiosperm tree litter. *Biology of plant litter decomposition* 1: 69-104.

Jiang, L., 2007. Negative selection effects suppress relationships between bacterial diversity and ecosystem functioning. *Ecology* 88: 1075-1085.

Jiang, L., Morin, P.J., 2004 Productivity gradients cause positive diversity-invasibility relationships in microbial communities. *Ecology Letters* 7: 1047-1057.

Kaneko, N., Salamanca, E.F., 1999. Mixed leaf litter effects on decomposition rates and soil microarthropod communities in an oak-pine stand in Japan. *Ecological Researh* 14: 131-138.

Kebli, H., Drouin, P., Brais, S., Kernaghan, G., 2011. Specie composition of saproxylic fungal communities on decaying logs in the boreal forest. *Soil Microbiology* 61: 898-910.

Keith, A.M., Van Der Wal, R., Brooker, R.W., Osler, G.H.R., Chapman, S.J., Burslem, D.F.R.P., Elston, D., 2008. Increasing litter species richness reduces variability in a terrestrial decomposer system. *Ecology* 89: 2657-2664.

Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 139-162.

Langenheder, S., Bulling, M.T., Solan, M., Prosser, J.I., 2010. Bacterial biodiversity-ecosystem functioning relations are modified by environmental complexity. *Plos One* 5: 1-9.

Lecerf, A., Risnoveanu, G., Popescu, C., Gessner, M.O., Chauvet, E., 2007. Decomposition of diverse litter mixtures in streams. *Ecology* 88: 219-227.

Leckie, S.E., 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology & Management* 220: 88-106.

McCann, K.S., 2000. The diversity-stability debate. *Nature* 405: 228- 233.

McGrady-Steed, J., Harris, P.M., Morin, P.J., 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature* 390: 162-165.

McTiernam, K.B., Ineson, P., Coward, P.A., 1997. Respiration and nutrient release from tree leaf litter mixtures. *Oikos* 78: 527-538.

Meentemeyer, V., 1978. Macroclimate and lignin control of litter decomposition rates. *Ecology* 59: 465-472.

Melillo, J.M., Aber, J.D., Steudler, P.A., Schimel, J.P., 1982. Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. *Ecology* 63: 621-626.

Migge, S., Maraun, M., Scheu, S., Schaefer, M., 1998. The orabatid mite community (Acarina) of pure and mixed stands of beech (*Fagus sylvatica*) and spruce (*Picea abies*) of different age. *Applied Soil Ecology* 9: 115-121.

Neely, C.L., Beare, M.H., Hargrove, W.L., Coleman, D.C., 1991 Relationships between fungal and bacterial substrate-induced respiration, biomass and plant residue decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 947-954.

Ono, K., Hiradate, S., Morita, S., Ohse, K., Hirai, K., 2011. Humification processes of needle litters on forest floors in Japanese cedar (Cryptomeria *japonica*) and Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) plantations in Japan. *Plant and Soil* 338: 171-181.

Osono, T., 2003. Effects of prior decomposition of beech leaf litter by phyllosphere fungi on substrate utilization by fungal decomposers. *Mycoscience* 44: 41-45.

Osono, T., Takeda, H., 2001. Organic chemical and nutrient dynamics in decomposing beech leaf litter in relation to fungal ingrowth and

succession during 3-year decomposition processes in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Ecological Research* 16: 649-670.

Parton, W., Silver, W.L., Burke, I.C., Grassens, L., Harmon, M.E., Currie, W.S., King, J.Y., Adair, E.C., Brandt, L.A., Hart, S.C., Fasth, B., 2007 Global-scale similarities in nitrogen release patterns during long-term decomposition. *Science* 315: 361-364.

Preston, C.M., Nault, J.R., Trofymow, J.A., 2009. Chemical changes during 6 years of decomposition of 11 litters in some Canadian forest sites. Part 2. 13C abundance, solid-state ^{13}C NMR spectroscopy and the meaning of ‘‘lignin’’. *Ecosystems* 12: 1078-1102.

Replansky, T., Bell, G., 2009. The relationship between environmental complexity, species diversity and productivity in a natural reconstructed yeast community. *Oikos* 118: 233-239.

Robinson, C.H., Dighton, J., Frankland, J.C., Coward, P.A., 1993 Nutrient and carbon dioxide release by interacting species of straw decomposing fungi. *Plant & Soil* 151: 139-142.

Rovira, P., Vallejo, V.R., 2007. Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 202-213.

Rutigliano, F.A., Virzo De Santo, A., Berg, B., Alfani, A., Fioretto, A., 1996. Lignin decomposition in decaying leaves of *Fagus sylvatica* L. and needles of *Abies alba* Mill. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 101-106.

Salamanca, E.F., Kaneko N., Katagiri S., 1998. Effects of leaf litter mixtures on the decomposiiton of *Quercus serrata* and *Pinus densiflora* using field and laboratory microcosms methods. *Ecological Engineering* 10: 53-73.

Schimel J.P., Cates R.G., Ruess, R., 1998. The role of balsam poplar secondary chemicals in controlling soil nutrient dynamics through succession in the Alaskan taiga. *Biogeochemistry* 42: 221-234.

Seastedt, T.R., 1984. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review of Entomology* 29: 25-46.

Setäla, H., 2002. Sensitivity of ecosystem functioning to changes in trophic structure, functional group composition and species diversity in bellowground food webs. *Ecological Research* 17: 207-215.

Setäla, H., McLean, M.A., 2004. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* 139: 98-107.

Silver, W.L., Miya, R.K., 2001. Global patterns in root decomposition: comparisons of climate and litter quality effects. *Oecologia* 129: 407-419.

Staff, H., 1980. Influence of chemical composition, addition of raspberry leaves, and nitrogen supply on decomposition rate and dynamics of nitrogen and phosphorus in beech leaf litter. *Oikos* 35: 55-62.

Swift, M.J., **Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979.** Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Blackwell, Oxford, pp. 372.

Taylor, B.R., Parkinson, D., Parsons, W.F.J., 1989. Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology* 70: 97-104.

Thomas, W.A., 1968. Decomposition of loblolly pine needles with and without addition of dogwood leaves. *Ecology* 49: 568-571.

Tilman, D., 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80: 1455-1474.

Tilman, D., Reich, P.B., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C., 2001 Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Nature* 441: 629-632.

Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecology Letters* 8: 618-625.

van der Heijden, M.G.A., et al., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.

Wardle, D.A., 1999. Is "sampling effect" a problem for experiments investigating biodiversity-ecosystem function relationships? *Oikos* 87: 403-407.

Wardle, D.A., Bonner, K.I., Nicholson, K.S., 1997. Biodiversity and plant litter: experimental evidence which does not support the view that enhanced species richness improves ecosystem function. *Oikos* 79: 247-258.

Wardle, D.A., Nilsson, M.C., Zackrisson, O., Gallet, C., 2003 Determinants of litter mixing effects in a Swedish boreal forest *Soil Biology & Biochemistry* 35: 827-835.

Wardle, D.A., Yeates, G.W., Barker, G.M., Bonner, K.I., 2006. The influence of plant litter diversity on decomposer abundance and diversity. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1052-1062.

Capitolo 3
La fungistasi

3.1. La fungistasi

Il termine fungistasi, spesso indicato anche come micostasi, è stato utilizzato per la prima volta da Dobbs e Hinson nel 1953 per indicare la diffusa capacità dei suoli di inibire la germinazione delle spore fungine o la crescita delle ife. In letteratura si ritrovano diverse definizioni di fungistasi, legate principalmente al tipo di struttura fungina cui si riferiscono. Watson & Ford (1972) definirono la fungistasi come il fenomeno secondo il quale, anche a condizioni favorevoli di temperatura e umidità del suolo, i propaguli vitali di un fungo non soggetti a dormienza endogena o costitutiva, non germinano oppure la crescita delle ife fungine è rallentata o si blocca.

La fungistasi è anche considerata una dormienza esogena delle spore ed è molto frequente nel terreno, ma è presente anche sulle superfici fogliari (Blakeman 1981). La fungistasi è un fenomeno indotto dall'attività antagonistica attraverso l'antibiosi e la competizione da parte dei microrganismi. Le spore spesso non riescono a germinare negli strati superficiali del terreno, dove la popolazione microbica è elevata, mentre germinano in terreno sterilizzato o in zone sub-superficiali, caratterizzate da bassa attività microbica. La germinazione può venir bloccata anche in terreno sterilizzato, qualora lo stesso sia stato ricolonizzato da microorganismi, e persino un singolo organismo, di tipo diverso a seconda dei casi, è capace di ristabilire la soppressione. Si pensa che la fungistasi sia dovuta alla competizione nutrizionale, oppure da metaboliti microbici generici, ma non da antibiotici specifici. Tuttavia le prove più evidenti indicano nella competizione nutrizionale la componente chiave della

fungistasi. Secondo questa ipotesi (Lockwood 1977), anche le spore capaci di germinare in acqua vengono inibite nel terreno in quanto, durante il processo di idratazione, rilasciano nutrienti nell'ambiente immediatamente circostante e questi nutrienti vengono metabolizzati rapidamente ed in modo continuo da altri microorganismi. Uno dei migliori esempi documentati riguarda la competizione per il carbonio organico tra le forme patogene e non patogene di *Fusarium oxysporum* (Fravel et al. 2003).

La fungistasi è stata ampiamente studiata negli anni '60 e '70 (es. Papavizas 1968; Lewis & Papavizas 1977) come revisionato da Lockwood (1977). Le ricerche condotte negli anni '60 e '70 erano focalizzate nello studio dei meccanismi della fungistasi e sull'effetto dell'ammendamento organico (revisione in Bonanomi et al. 2007). In seguito, la fungistasi ha ricevuto meno attenzione poiché gli studi si sono concentrati sul possibile utilizzo di microrganismi benefici per il controllo dei patogeni dei vegetali e sullo studio dei substrati e del suoli soppressivi (Hoitink & Boehm 1999; Mazzola 2002; Weller et al. 2002; Harman et al. 2004; Borneman & Becker 2007). Comunque, poiché tali strategie di biocontrollo hanno spesso portato a risultati inconsistenti nella loro applicazione pratica (Whipps 1997), negli ultimi anni l'interesse per la fungistasi è nuovamente cresciuto (Bonanomi et al. 2010; Garbeva et al. 2011). Tale rinnovato interesse per la fungistasi è in parte legato dalla crescente sensibilità verso il concetto di "sostenibilità" delle attività agricole.

In gran parte degli studi la fungistasi è stata quantificata monitorando la germinazione delle spore (Alabouvette et al. 2006). Comunemente le spore vengono incubate direttamente nel suolo o in substrati che sono stati in contatto costante o temporaneo con il suolo. Dopo un periodo di incubazione, la percentuale di spore germinate e/o la crescita ifale sono determinato microscopicamente. Questo semplice metodo è tuttora in uso (Alabouvette et al. 2006).

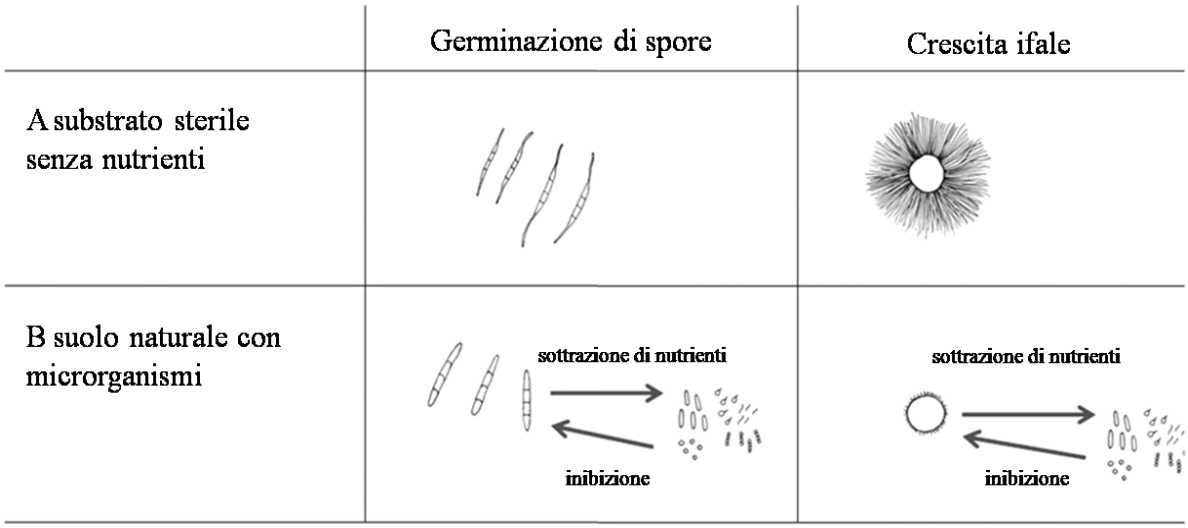

Figura 3.1 La germinazione delle spore fungine e la crescita ifale sono inibite in substrati dove la precedente presenza di microganismi attivi ha ridottola disponibilità di risorse trofiche e/o ha prodotto metaboliti con attività fungitossica. La fungistasi del suolo può quindi essere determinata dalla carenza di nutrienti e/o di sostanza organica o dalla produzione di sostanze fungitossiche da parte dei microrganismi (modificato da Garbeva et al. 2011).

Dobbs & Hinson (1953) attribuirono la fungistasi alla presenza di composti fungitossici di origine microbica, e questo concetto fu in seguito supportato da altri studi (Garbeva et al. 2011). Tali sostanze ad azione antifungina possono essere prodotte dal metabolismo secondario dei numerosi microrganismi tellurici e possono essere volatili oppure solubili, organiche e/o inorganiche (Xu et al. 2004). Il ruolo degli inibitori nell'indurre la fungistasi è stato però messo in discussione da Lockwood e colleghi (Lockwood & Lingappa 1963; Lockwood 1977; Lockwood 1990) i quali affermarono che la competizione per i nutrienti e i composti organici è la causa più principale nel determina il fenomeno della fungistasi. Lockwood contestò la teoria degli inibitori principalmente a seguito delle seguenti osservazioni:

i) una temporanea riduzione della fungistasi dopo l'aggiunta di sostanze nutritive (sostanze organiche facilmente decomponibili) a suoli non sterili;

ii) l'esistenza di una relazione inversa tra la grandezza dei propaguli

fungini (legati alla quantità di nutrienti presenti all'interno dei propaguli) e la loro sensibilità alla fungistasi;

iii) l'aumento della sensibilità alla fungistasi quando si creano delle condizioni artificiali di sottrazione dei nutrienti.

In altre parole, il fenomeno sarebbe dipendente direttamente dalla disponibilità di carbonio organico a diposizione dei propaguli fungini (Curl 1982). Quindi, da un lato la teoria dell'inibizione sostiene che l'attività microbica produce sostanze inibitorie che impediscono lo sviluppo fungino. Dall'altro canto la teoria della sottrazione di nutrienti afferma che la riduzione delle sostanze nutritive limita la germinazione fungina o la crescita ifale. Probabilmente, in natura il fenomeno della fungistasi è indotto da entrambi i fattori contemporaneamente, sebbene la loro relativa importanza può variare con le condizioni ecologiche e pedologiche.

Un altro fattore agronomico in grado di influenzare la fungistasi del suolo è l'applicazione di sostanza organica (Papavizas 1968). Alcuni studi indicano che il diverso grado di decomposizione della sostanza organica può limitare la disponibilità di risorse e di conseguenza influenzare il fenomeno. Tenendo conto dei dati presenti in letteratura (revisione in Bonanomi et al. 2007), emerge che l'utilizzo di sostanza organica può essere uno strumento utile per indurre condizioni di fungistasi nei suoli. Risulta altresì necessario ricordare il duplice e contrastante effetto dell'ammendamento organico: negativo nel breve periodo e positivo nel lungo periodo. In un recente studio (Bonanomi et al. *dati non* pubblicati) è stato rilevato che il lasso temporale entro il quale l'ammendamento del suolo con sostanza organica determinava la perdita della fungistasi varia fra 3 e 10 giorni, in funzione dell'ammendante utilizzato ma soprattutto della specie di fungo considerata. In particolare, la fungistasi era rapidamente eliminata per *Botritys cinerea*, *Mucor* sp. e *Trichoderma harzianum*. E' possibile quindi affermare, coerentemente con quanto riportato in letteratura

(Papavizas 1968; Lockwood 1977), che l'apporto di sostanza organica nel breve periodo determina la riduzione della fungistasi. In base a tali considerazioni, appare paradossale proporre l'utilizzo di sostanza organica per indurre soppressività nei suoli, in quanto questa tecnica ha l'effetto contrario. Analizzando però come l'ammendamento influenza la fungistasi nel medio -lungo periodo, dell'ordine di grandezza delle settimane, si rilevava un effetto opposto. Infatti, risultava chiaro che la fungistasi veniva ad essere indotta per *B. cinerea*, *Mucor* sp. e *T. harzianum* dopo 7-30 giorni dall'ammendamento. Non solo, dai dati relativi alla germinazione e alla crescita ifale nei trattamenti con aggiunta di sostanza organica la fungistasi era indotta a livelli superiori rispetto a quelli del substrato di controllo non ammendato. Questo indica la necessità di individuare parametri chimici, biochimici o microbici in grado di identificare con certezza se il suolo si trova in condizioni di fungistasi o meno, a seguito dell'ammendamento organico.

3.2. I suoli soppressivi

In numerosi agro-ecosistemi è stata osservata la naturale capacità dei suoli di limitare lo sviluppo di malattie fungine indotte da patogeni tellurici di rilevante interesse agrario (Janvier et al. 2007). I suoli dotati di tali caratteristiche sono indicati come soppressivi e sono definiti come "i suoli dove il patogeno non attecchisce, non persiste, oppure attecchisce ma causa danni molto limitati" (Baker & Cook 1974). Un'altra definizione indica come soppressivi i suoli in cui si realizza la soppressione dei patogeni grazie alla presenza di una microflora nativa caratterizzata da un'elevata biodiversità e attività biologica. Viceversa, i suoli conducivi sono quelli in cui la malattia riesce a svilupparsi velocemente producendo così elevati danni alle colture. Difatti, tutti i suoli possiedono un certo potenziale di soppressività e tale proprietà è dimostrata dalla maggiore virulenza dei

patogeni a seguito della sterilizzazione del suolo rispetto ai suoli non trattati (Weller et al. 2002; Termorshuizen & Jeger 2008). In termini generali, la soppressività naturale è conferita dall'attività della comunità microbica residente nel suolo e da specifiche combinazioni di fattori chimici e fisici del suolo. I suoli soppressivi indubbiamente devono la loro attività ad una combinazione di fattori fisici, chimici e microbiologici. Sono stati descritti suoli soppressivi per molti patogeni terricoli come *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces euteiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamomi*, Pythium *splendens*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies* e *Plasmodiophora brassicae* (revisione in Hoitink & Boehm 1999; Weller et al. 2002; Bonanomi et al. 2007; Janvier et al. 2007).

In relazione ai fattori biologici coinvolti nel controllo dei patogeni, i suoli soppressivi probabilmente sono il miglior esempio in cui la microflora nativa protegge effettivamente l'organismo vegetale dall'attacco dei patogeni tellurici. La soppressività appare chiara perché l'incidenza delle malattie è nettamente inferiore a quella degli stessi suoli sottoposti a trattamenti di sterilizzazione, che ne limitano le attività biologiche intrinseche. In altre parole, la soppressività del suolo è determinata dall'attività della biomassa microbica totale e alla sua biodiversità. È quindi importante precisare che la soppressività spesso non è solitamente imputabile ad un singolo microrganismo (Baker & Cook 1974). L'importanza della microflora tellurica nel determinare la soppressività del suolo è dimostrata attraverso varie tecniche. Ad esempio la misura dell'attività enzimatica idrolitica complessiva, che è una stima dell'attività microbica totale, viene spesso utilizzata come indice della soppressività verso *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* ed altri patogeni. Un'ulteriore strategia utilizzata per determinare le basi microbiologiche della soppressività prevede di:

- Determinare quali fattori abiotici riducono o eliminano la soppressività. Comunemente la soppressività viene eliminata dalla sterilizzazione con raggi gamma o attraverso trattamenti termici intensi (trattamento in autoclave; +121 °C per 20 minuti). Differentemente, le fumigazioni o la pastorizzazione (+60 °C per 30 minuti) ne riducono l'intensità ma non la eliminano completamente
- Verifica del coinvolgimento della microflora nella soppressività attraverso il trasferimento di una piccola aliquota (1-10%) di suolo soppressivo in un suolo conduttivo. Il ruolo della microflora è dimostrato, quando il suolo conduttivo diviene soppressivo a seguito dell'aggiunta della nuova comunità microbica.

Diversi studi hanno analizzato la relazione tra la composizione della comunità microbica del suolo e la soppressione di malattie causate da specifici patogeni tellurici (*soppressività specifica*) (Mazzola & Gu 2002; Borneman & Becker 2007). Alcune specie batteriche (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*) e fungine (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Sporidesmium*, *Fusarium* spp. non patogeni) sono state identificate come antagonisti di uno o più patogeni vegetali tellurici (Berg et al. 2002; Cotxarrera et al. 2002; Garbeva et al. 2004). La soppressività specifica è stata spesso legata alla produzione di antibiotici che agiscono contro i patogeni o alla sovrapposizione delle nicchie ecologiche tra gli antagonisti e i patogeni rispetto alla preferenza di substrati o micro-habitat (es. siti d'infezione sulle radici) (Mazurier et al. 2009; Raaijmakers et al. 2010). Al contrario, le interazioni antagonistiche specifiche non sono considerate come una componente della fungistasi. Comunque, studi recenti indicano che potrebbero esserci delle differenze nel contributo che i differenti microrganismi apportano nel determinare la fungistasi e alla soppressività dei suoli. In questa direzione esistono due

linee di ricerca, cioè esperimenti di laboratorio che manipolano le comunità microbiche e studi di campo che correlano la composizione della comunità microbica del suolo con la fungistasi e la soppressività (Garbeva et al. 2011). Per esempio, Boer et al. (2003) hanno indotto variazioni nella comunità microbica del suolo tramite sterilizzazione parziale e applicazione di ammendanti organici. Tali fattori hanno poi comportato una modifica dei livelli di fungistasi nei confronti di diversi funghi tellurici. Per poter indagare se la composizione della comunità microbica influisce sulla fungistasi anche in condizioni naturali è necessario selezionare situazioni di campo in cui non è attesa alcuna inibizione legata a fattori abiotici. Per esempio, la crescita ifale di *Trichoderma harzianum* in suoli di praterie di dune costiere è risultato inversamente correlato col il pH del suolo (De Boer et al. 2003) e quindi l'effetto fungistatico potrebbe essere confuso con il pH. Garbeva et al. (2004) hanno osservato una correlazione positiva tra il livello di diversità microbica e l'inibizione dello sviluppo ifale di *Rhizoctonia solani* in suoli con una differente gestione del suolo. L'impatto delle pratiche colturali è stato osservato anche sulla presenza di batteri dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas* con una chiara correlazione negativa tra la crescita ifale di *R. solani* e la diversità di questi gruppi microbici. Una correlazione positiva tra la diversità microbica e soppressività è stata riscontrata in alcuni studi, ma è bene ricordare che altri lavori hanno riportato correlazioni non significative tra queste due variabili (Bonanomi et al. 2011a). La correlazione tra diversità microbica e la fungistasi potrebbe dipendere da interazioni sinergiche come quelle tra popolazioni che producono metaboliti secondari tossici, oppure ad una maggiore efficienza collettiva nella rimozione dei nutrienti (Garbeva et al. 2011).

Esistono diverse evidenze empiriche a supporto del fatto che la struttura delle comunità microbiche, lo loro l'attività e la loro diversità influiscono in maniera determinante sulla soppressività e la fungistasi del

suolo. Ne consegue che le attività di gestione del suolo che influenzano la composizione della comunità microbica, come le rotazioni, le consociazioni, gli ammendamenti organici possono modificare l'intensità della fungistasi e la generale soppressione delle malattie (Bailey & Lazarovits 2003; Termorshuizen et al. 2007; Janvier et al. 2007). Oltre alla composizione della comunità microbica, anche le interazioni all'interno della comunità può svolgere un ruolo significativo nella fungistasi del suolo. Per esempio, de Boer et al. (2007) hanno dimostrato che isolati batterici non antagonisti quando erano coltivati insieme producevano consorzi microbici altamente soppressivi. In questo studio, una mescolanza di isolati batteri tellurici (*Brevundimonas* sp., *Luteibacter* sp., *Pedobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.) cresciuti in consorzio in condizioni di carbonio organico limitante inibiva fortemente la crescita di due funghi patogeni come *Rhizoctonia solani* e *Fusarium culmorum* ed un fungo micoparassitico/saprofitico (*Trichoderma harzianum*). Comunque, quest'inibizione non è stata rilevata per le monocolture degli stessi batteri. In seguito, è risultato chiaro che le interazioni competitive interspecifiche innescano la produzione di antibiotici a largo spettro con un effetto inibitorio sui funghi (Garbeva & de Boer 2009). Questo risultato suggerisce che molti ceppi che, sulla base di saggi condotti utilizzando singoli isolati, erano creduti inefficaci nella soppressione alle malattie fungine ricoprono potenzialmente un ruolo importante. Inoltre, noti batteri produttori di antibiotici possono intensificare la loro produzione di sostanze inibitorie quando sono coinvolti in interazioni interspecifiche (Dubuis et al. 2007; Mazurier et al. 2009).

E' necessario sottolineare che, nonostante i progressi verso la comprensione dei meccanismi su cui si basa la soppressività, notevoli sono state le difficoltà nell'applicazione delle conoscenze acquisite. Dall'insieme delle conoscenze acquisite si evince anche cha la soppressività e la

fungistasi sono fenomeni influenzati dalla composizione e dalla diversità delle comunità microbiche. Nonostante ciò molto scarsi sono gli studi che hanno indagato esplicitamente l'effetto della diversità microbica sulla fungistasi. In particolare in letteratura è presente un solo studio che ha valutato come la fungistasi dei suoli variava lungo un gradiente di diversità microbica indotto attraverso trattamenti termici (Wu et al. 2008).

3.3. Obiettivi dello studio

Lo studio aveva come obiettivo generale indagate la relazione fra diversità microbica, in presenza di fattori ambientali variabili, e fungistasi del suoli. A tale fine è stato selezionato l'approccio delle comunità sintetiche utilizzando comunità con differenti livelli di complessità (da 1 fino a 8 specie presenti contemporaneamente). Le specifiche ipotesi che sono state indagate erano: (1) la fungistasi dei suoli è più intensa ed è indotta più rapidamente all'aumentare della diversità microbica?; (2) l'effetto della diversità dipende dalla qualità della sostanza organica?; (3) la variabilità del fenomeno fungistasi è legato alla diversità microbica?

3.4. Materiali e Metodi

3.4.1. Assemblaggio delle comunità microbiche

L'effetto della diversità microbica sulla fungistasi dei suoli è stata indagata attraverso una serie di esperimenti condotti con l'approccio delle comunità microbiche sintetiche in condizioni controllate di temperatura ed umidità. La fungistasi è stata sempre valutata in base alla germinazione di spore di due funghi: *Mucor* sp. e *Trichoderma harzianum*.

I consorzi microbici sono stati allestiti secondo i principi descritti nel Capitolo 2. In breve, le specie microbiche che andavano a costituire i consorzi sono state prelevate a caso da un pool di otto specie (Tabella 3.1). A partire dal pool di otto specie sono state assemblate a caso dodici comunità fungine a tre livelli di diversità microbica (1, 2 e 8 specie) (Tabella 3.2). I microcosmi sono stati inoculati mantenendo costante la concentrazione dei propaguli fungini e di cellule batteriche al variare della diversità microbica (10^3 conidi mL^{-1}). L'inoculo fungino è stato ottenuto da colture pure di circa 10 giorni cresciute su PDA. Su tali colture sono stati aggiunti 10 mL di acqua sterile e la superficie frizionata per rimuovere i conidi. La sospensione così ottenuta è stata filtrata, centrifugata e risciacquata tre volte in acqua sterile. Infine, la concentrazione di conidi è stata quantificata tramite emocitometro e successivamente portata a 1×10^5 conidi mL^{-1}. L'inoculo è stato effettuando applicando 500 µl delle sospensioni conidiche dopo diluizione finalizzata ad ottenere la concentrazione desiderata che era dipendente dal numero di specie dei consorzi microbici.

n°	Specie	Phylum	Ordine
1	*Aspergillus niger*	Ascomycota	Eurotiales
2	*Aspergillus* sp.	Ascomycota	Eurotiales
3	*Cladosporium cucumerinum*	Ascomycota	Capnodiales
4	*Penicillium restrictum*	Ascomycota	Eurotiales
5	*Penicillium* sp.	Ascomycota	Eurotiales
6	*Trichoderma harzianum*	Ascomycota	Hypocreales
7	*Trichoderma* sp.	Ascomycota	Hypocreales
8	*Umbelopsis ramanniana*	Zygomycota	Mucorales

Tabella 3.1. Elenco delle specie fungine utilizzate per assemblare le comunità sintetiche negli esperimenti di fungistasi.

Numero di specie nelle comunità	Numero di combinazioni	Numero di repliche identiche	Microcosmi totali
1	8	1	8
2	4	1	4
8	1	2	2
TOTALE	13	-	14

Microcosmi totali	Numero di substrati organici	Tempi di decomposizione	Repliche
14	2	2	3
TOTALE	-	-	168

Tabella 3.2. Sintesi del disegno sperimentale dell'esperimento volto a indagare la relazione tra diversità microbica e fungistasi. Le specie fungine sono state scelte a caso da un pool di 8 specie per costituire le comunità sintetiche.

3.4.2. Selezione dei materiali organici ed esperimento di decomposizione

Gli esperimenti sono stati condotti allestendo dei microcosmi in contenitori tipo Magenta. Ognuno contenitore conteneva 50g di sabbia di quarzo sterile addizionati con acqua sterile. Ogni comunità sintetica è stata trasferita in microcosmi ammendati con due tipologie di substrati organici:

a) una sospensione allo 0,5% di foglie di *Medicago sativa* (EM);

b) PDB, un comune mezzo di crescita per funghi, alla concentrazione del 5%.

E' noto in letteratura che il grado di decomposizione dei residui di *M. sativa* può influenzare notevolmente lo sviluppo dei funghi. Infatti, Bonanomi et al. (2011b) hanno provato che il grado di decomposizione dei residui di erba medica influiscono notevolmente sullo sviluppo di alcuni funghi, tra cui due patogeni vegetali tellurici (*Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*). A seguito dell'applicazione degli ammendanti organici e delle comunità microbiche i microcosmi sono stati incubati a 24°C. Dopo 3 e 10 giorni di decomposizione è stata ottenuta una sospensione acquosa aggiungendo acqua sterile in un rapporto di 1:1 tra suolo e acqua. La sospensione è stata poi centrifugata e filtro-sterilizzata (0,22 µm). Nel complesso sono stati allestiti 168 microcosmi (14 combinazioni microbiche x 2 materiali organici x 2 tempi di decomposizione x 3 repliche).

La fungistasi delle sospensioni sterili è stata quantificata tramite test di germinazione con *Mucor* sp. e *T. harzianum.* In breve, 10^3 spore sono state applicate in pozzetti di piastre ELISA in cui erano state applicate le differenti sospensioni derivanti dai microcosmi. In ogni pozzetto, il volume finale complessivo è stato di 100µl ed ogni trattamento è stato replicato tre volte. La germinazione delle spore è stata valutata 24 ore a seguito dell'inoculo.

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA)

a tre vie. In dettaglio per ogni specie fungina (*Mucor* sp. e *T. harzianum*) il tempo di decomposizione (3 e 10 giorni), il tipo di materiale organico (*M. sativa* e PDB) e la ricchezza di specie (1, 2 e 8 specie) erano i fattori in analisi. I dati di perdita di germinazione sono stati trasformati (logaritmo) al fine di soddisfare l'assunto che i dati siano distribuiti normalmente.

3.5. Risultati

Le spore di entrambi i funghi hanno mostrato una germinazione molto elevata e prossima al 100% sulle sospensioni derivanti da entrambi i substrati organici non decomposti. Al contrario, la germinazione di *T. harzianum* è stata fortemente inibita quando le sue spore erano inoculate nelle sospensioni di erba medica e di PDB decomposte per 3 ma soprattutto per 10 giorni. Quando la decomposizione da parte dei consorzi viene interrotta dopo 3 giorni, la germinazione è risultata inferiore nei microcosmi inoculati con le comunità a maggior diversità rispetto a quelli monospecifici (Fig. 3.2). Infatti, le sospensioni decomposte dalle comunità composte da 8 funghi presentano un effetto significativamente maggiore rispetto alle comunità di 2 funghi e, in particolare, rispetto alle monocolture. Tale effetto è risultato simile per entrambi i substrati organici utilizzati (Fig. 3.2.). Con il procedere della decomposizione l'inibizione della germinazione delle spore si incrementa per tutti i consorzi microbici utilizzati (Fig. 3.2). Nonostante ciò, i consorzi a maggior diversità, composti cioè da 2 e 8 specie, mostravano una inibizione significativamente superiore rispetto a quella indotta dalle monocolture (Fig. 3.2).

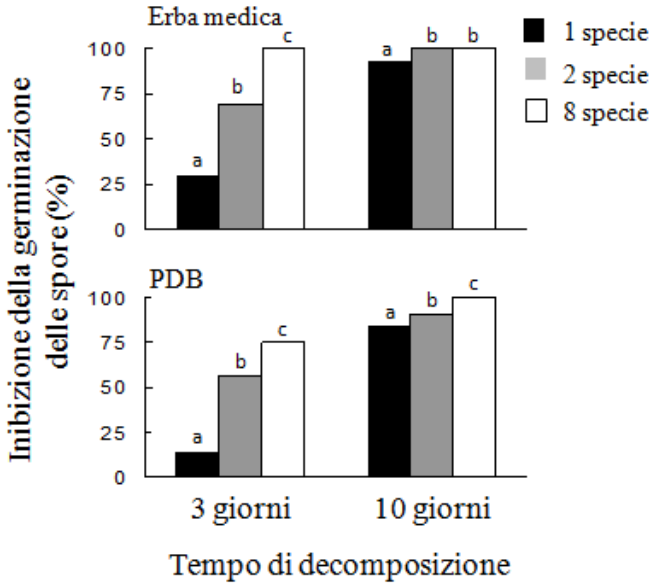

Figura 3.2. Inibizione della germinazione della spore di *Trichoderma harzianum* dopo 3 e 10 giorni di decomposizione dei residui di erba medica (EM) e PDB inoculati con comunità microbica con diversità crescente. Le lettere indicano differenze statisticamente significative (Duncan test $p < 0.05$).

Per *T. harzianum* la variabilità dell'inibizione della germinazione, espressa come coefficiente di variabilità (deviazione standard/media) diminuisce significativamente con il numero di specie costituenti i consorzi microbici (Fig. 3.3). Infatti, dopo 3 giorni di decomposizione, il coefficiente di variabilità è molto più alto in corrispondenza delle monocolture rispetto alle comunità composte da due funghi. Quando i substrati organici sono decomposti per 10 giorni si registra una generale riduzione del coefficiente di variabilità che comunque rimane più alto per i consorzi monospecifici.

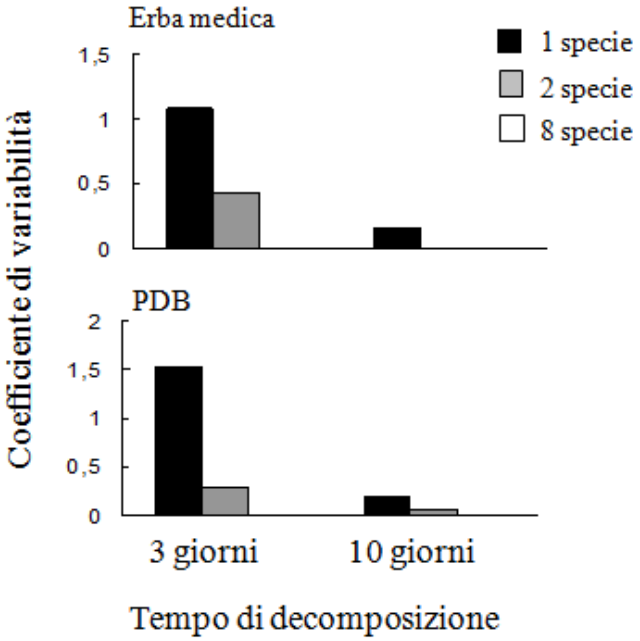

Figura 3.3. Variabilità dell'inibizione della germinazione di spore di *Trichoderma harzianum* espressa come coefficiente di variabilità calcolate tra le diverse comunità entro ogni livello di diversità.

Anche per quanto concerne *Mucor* sp. l'inibizione della germinazione delle spore è stata influenzata in maniera significativa dal tempo di decomposizione e dalla ricchezza di specie dei consorzi. Nella sospensione di erba medica, infatti, all'aumentare del numero di specie microbiche si riduce gradualmente la germinazione delle spore di *Mucor*. L'inibizione risulta quasi totale in corrispondenza delle comunità composte da 8 funghi (Fig. 3.4; Fig. 3.6). Dopo 10 giorni di decomposizione, invece, anche per le monocolture l'inibizione è molto intensa. In PDB, dopo 3 giorni di decomposizione, la germinazione delle spore di *Mucor* è poco inibita rispetto a quanto accade nella sospensione di erba medica. Importante però notare che le comunità costitute da otto specie inducono già dopo tre giorni una forte inibizione della germinazione (Fig. 3.4). Dopo 10 giorni di decomposizione, ad un incremento del numero di specie fungine nei consorzi corrisponde un incremento dell'inibizione della germinazione delle spore. Anche nel caso di *Mucor* sp. il coefficiente di variabilità

dell'inibizione della germinazione è risultato inversamente correlato con la diversità microbica delle comunità sintetiche (Fig. 3.5.). Tale risultato era evidente ad entrambe le date di rilievo, sebbene il coefficiente di variabilità tenda a diminuire con il procedere della decomposizione (Fig. 3.5).

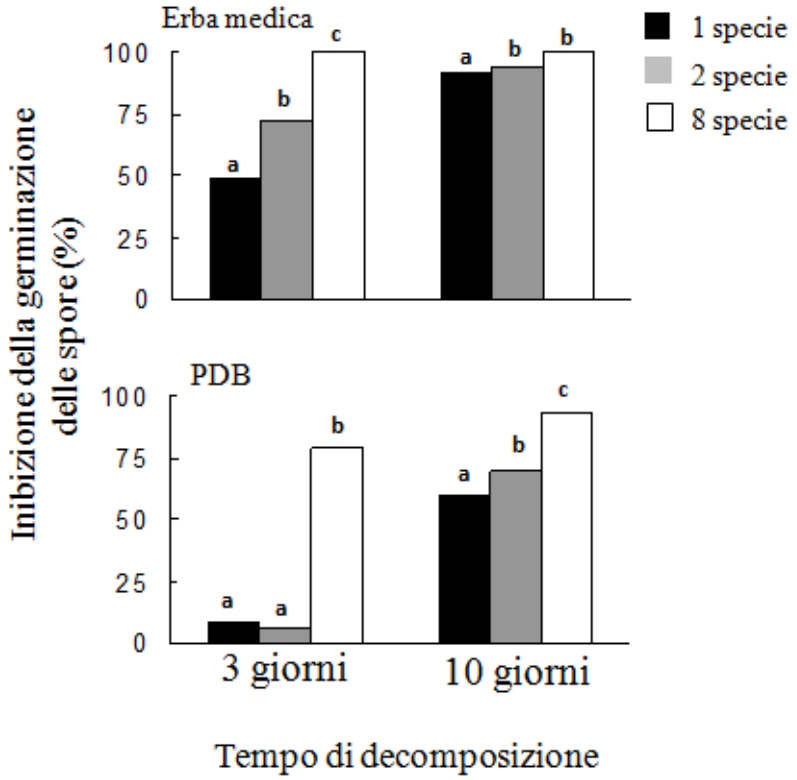

Figura 3.4. Inibizione della germinazione della spore di *Mucor* dopo 3 e 10 giorni di decomposizione dei residui di erba medica (EM) e PDB inoculati con comunità microbica con diversità crescente. Le lettere indicano differenze statisticamente significative (Duncan test $p < 0.05$).

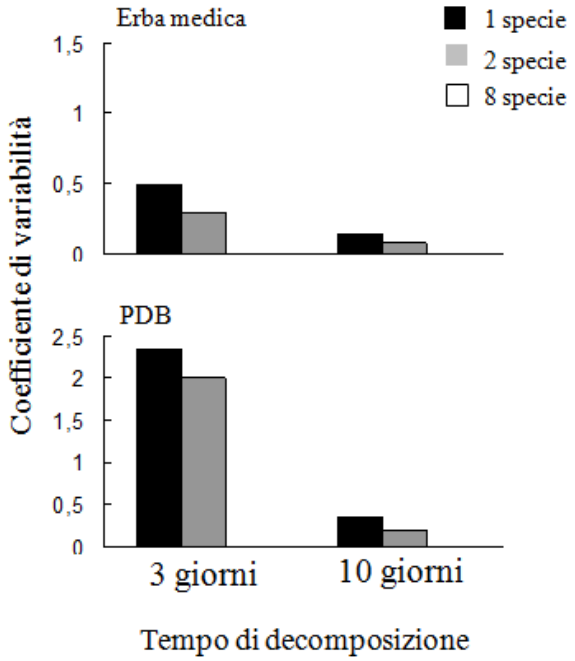

Figura 3.5 Variabilità dell'inibizione della germinazione di spore di *Mucor* sp. espressa come coefficiente di variabilità calcolate tra le diverse comunità entro ogni livello di diversità.

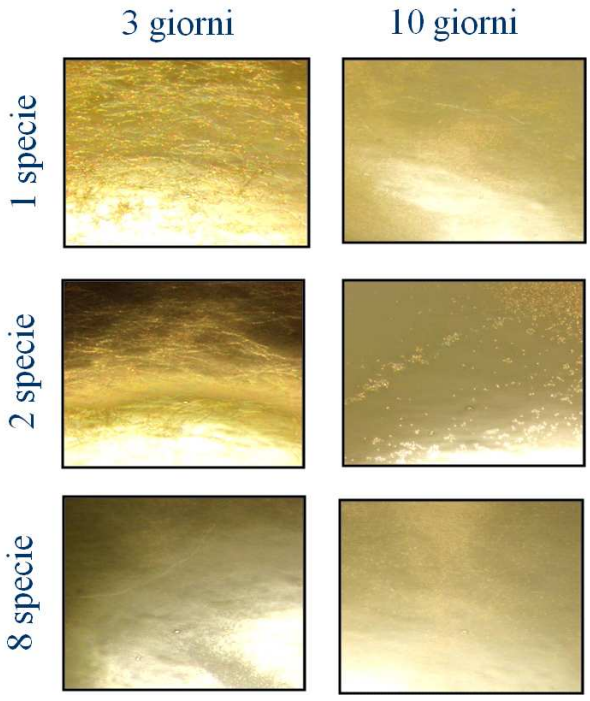

Figura 3.6 Immagine delle spore di *Mucor* inoculate in una sospensione di *Medicago sativa* decomposta da consorzi a 3 livelli di diversità a due tempi.

3.6. Discussione

L'esperimento sopra descritto, il primo che ha manipolato il numero di specie all'interno di comunità microbiche sintetiche nel contesto della fungistasi dei suoli, ha mostrato un netto effetto positivo della diversità sulla fungistasi. Inoltre, la relazione positiva tra diversità microbica e fungistasi è stata consistentemente rilevata per i due tipi di materiali organici e i due funghi utilizzati.

Il principio cardine su cui si basa l'idea di consorzio microbiologico è quello che la presenza di un'elevata biodiversità metabolica garantisce una maggiore affidabilità in condizioni ambientali mutevoli (Brenner et al. 2008). La maggiore resistenza e resilienza alle perturbazioni ambientali potrebbe essere determinata dalla complementarietà funzionale, fenomeno importante soprattutto nello svolgere processi complessi come la decomposizione della sostanza organica. In questo contesto, l'esperimento effettuato in presenza di microcosmi caratterizzati da ricchezza di specie crescente è, ovviamente, solo un primo approccio allo studio delle relazioni fra biodiversità tellurica e la fungistasi. I risultati ottenuti sono però decisamente incoraggianti. Appare infatti chiaro che la fungistasi verso entrambi i fughi è positivamente correlata con la diversità microbica dei microcosmi. Inoltre, la fungistasi veniva indotta molto più rapidamente dalle comunità miste rispetto a quelle monospecifiche. La relazione fra le due variabili è però di tipo non lineare. Infatti, dai nostri dati emerge che i microcosmi monospecifici possono essere soppressivi, ma tale proprietà risulta transitoria nel tempo e fortemente variabile fra le diverse comunità monospecifiche. Al contrario, i consorzi microbici con elevata diversità non solo sono mediamente più soppressivi, ma mantengono elevata la loro funzionalità nel tempo ed indipendentemente dalla loro composizione specifica. Dal punto di vista dei meccanismi che inducono fungistasi, con i dati disponibili è possibile solo supporre che i consorzi con maggiore

diversità siano in grado di competere in maniera più efficiente per i substrati organici e/o produrre una maggiore quantità o una più ampia gamma varietà di metaboliti con attività fungi statica (Garbeva et al. 2011). Futuri studi saranno necessari per comprendere se i consorzi a maggior diversità inducono più rapidamente la fungistasi attraverso la competizione per le risorse e/o producendo metaboliti fungitossici.

Nel complesso, i risultati ottenuti sono coerenti con quanti rilevato da studi precedenti volti ad indagare la relazione fra diversità vegetale e produttività primaria (Tilman et al. 2001) e diversità microbica e decomposizione della lettiera (Dang et al. 2005; vedi Capitolo 2 e 4). Di particolare interesse è la relazione positiva fra biodiversità dei consorzi e stabilità delle funzioni ecosistemiche, evidenziata nel nostro studio dalla riduzione del coefficiente di variabilità al crescere della diversità. Questo effetto della biodiversità, anche indicato come *portfolio effect* (Tilman 1999), indica che un sistema microbico con maggiore diversità non solo è più funzionale, ma è più affidabile nel tempo e in condizioni ambientali differenti, nel nostro caso i differenti ammendanti organici applicati ai microcosmi. Ricerche future dovranno indagare la compatibilità ecologica e fisiologica tra le differenti specie che compongono il consorzio, oltre che accrescere la comprensione dei meccanismi alla base delle interazioni microbiche di gruppo al fine di sviluppare dei consorzi microbici in grado di realizzare funzioni complesse, spesso precluse alle monocolture.

3.7. Referenze citate

Alabouvette, C., Raaijmakers, J.M., De Boer, W., Notz, R., Defago, G., Steinberg, C., Lemanceau, P., 2006. Concept and methods to assess the phytosanitary quality of soils. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. CABI Publishing, Wallingford 257-269.

Bailey, K.L., Lazarovits, G., 2003. Suppressing soil-borne diseases with residues management and organic amendments. *Soil & Tillage Research* 72: 169-180.

Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA.

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., Smalla, K., 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different Verticillium host plants. *Applied & Environmental Microbiology* 68: 3328-3338.

Blakeman, J.P., 1981. Microbial Ecology of the Phylloplane. Academic Press, London.

Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala, F. 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology* 89: 311-340.

Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 136-144.

Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A., 2011a. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Applied Soil Ecology* 47: 184-194

Bonanomi, G., Antignani V., Barile, E., Lanzotti, V., Scala F., 2011b. Decomposition of *Medicago sativa* residues and soil-borne pathogen diseases *Journal of Plant Pathology* 93: 57-69.

Borneman, J., Becker, J.O., 2007. Identifying microorganisms involved in specific pathogen suppression in soil. *Annual Review of Phytopathology* 45: 153-172.

Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26: 483-489.

Cotxarrera, L., **Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002.** Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 467-476.

Curl, E.A., 1982 The rizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. *Plant disease* 66: 624-630.

Dang, C.K., Chauvet, E., Gessner, M.O., 2005. Magnitude and variability of process rates in fungal diversity-litter decomposition relationships. *Ecology Letters* 8: 1129-1137.

De Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 835-844.

De Boer, W., Wagenaar, A.M., Paulien, J.A., Gunnewiek, K., Van Veen, J.A., 2007. *In vitro* suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria *FEMS Microbiology Ecology* 59: 177-185

Dobbs, C.G., Gash, M.J., 1965 Microbial and residual mycostasis in soils. *Nature* 207: 1354-1356.

Dobbs, C.G., Hinson, W.H., 1953. A widespread fungistasis in soil.

Nature 172: 197-199.

Dubuis C., Keel C., Haas D., 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol seudomonads. *European Journal of Plant Pathology* 119: 311-328.

Fravel, D., Olivian, C., Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.

Garbeva, P., de Boer, W., 2009. Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microbial Ecology* 58: 36-46.

Garbeva, P., Gera, W.H., Termorshuizen, A.J, Kowalchuk, G.A., de Boer, W., 2011. Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 469-477.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards Rhizoctonia solani AG3, of Pseudomonas species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 51-64.

Harman, E., Howell, R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* 2: 43-56.

Hoitink, H.A.J., Boehm M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446.

Hora, T.S., Baker R., 1970. Volatile factor in soil fungistasis. *Nature* 225: 1071-1072.

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1-23.

Lewis, J.A., Papavizas, G.C., 1977. Effect of plant residues on

chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. phaseoli and on Fusarium root rot of beans Phytopathology 67: 925-929.

Lockwood, J.L. 1977. Fungistasis in soils. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 52: 1-43.

Lockwood, J.L., 1990. Relation of energy stress to behaviour of soilborne plant pathogens and to disease development. In D. Hornby (Ed.), Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 197–214.

Lockwood, J.L., Lingappa, B.T., 1963. Fungitoxicity of sterilized soil inoculated with soil microflora. *Phytopathology* 58: 917-920.

Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., Raaijmakers J.M., 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to Fusarium wilt. *ISME Journal* 3: 977-991.

Mazzola, M., 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:557-564.

Mazzola, M., Gu, Y.H., 2002. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by Rhizoctonia solani anastomosis group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology* 92: 1300-1307.

Meitude, S., Fredrik, D., Bååth, E., 2008. Antagonistic and synergistic effect of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2334-2343.

Papavizas, G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. IV. Effect of amendments on bean root rot caused by Thielaviopsis basicola and on inoculum density of the causal organism. *Phytopathology* 58: 421-428.

Rousk J., Brookes P.C. & Baath E., 2009 Contrasting soil pH effects on

fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1589-1596.

Tilman, D., 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80: 1455-1474.

Tilman, D., Reich, P.B., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C., 2001 Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Nature* 441: 629-632.

Termorshuizen, A.J., Jeger, M.J., 2008 Strategies of soilborne plant pathogenic fungi in relation to disease suppression. *Fungal Ecology* 1: 108-114.

Termorshuizen, A.J., van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Rämert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmora-Nahum, S., 2007. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2461-2477.

Watson, A.G., Ford, E.J., 1972. Soil fungistasis e a reappraisal. *Annual Review of Phytopathology*10: 327.

Weller, D.M., **Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M, Thomashow, L.S., 2002.** Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-349.

Whipps, J.M., 1997. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-84.

Wu, M., Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Su, Z., Zhang, C., 2008. Soil fungistasis and its relations to soil microbial composition and diversity: A case study of a series of soils with different fungistasis. *Journal of Environmental Sciences* 20: 871-877.

Xu, C.K., Mo, M.H., Zhang, L.M., Zhang, K.Q., 2004. Soil volatile

fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1997-2004.

Capitolo 4

Invasibilità di consorzi microbici da parte di specie microbiche aliene

4.1. Le invasioni biologiche

L'invasione di habitat da parte di specie non residenti o invasive è un fenomeno globale con rilevanti conseguenze ecologiche ed economiche (Pimentel et al. 2000). L'interesse della ricerca è stato rivolto principalmente alle invasioni da parte di specie vegetali ed animali particolarmente dannose per gli ambienti acquatici e terrestri. Tali specie definite aliene, invasive o non native (Richardson et al. 2000; Pyšek et al. 2004), possono arrecare gravi squilibri agli ecosistemi naturali come agli agroecosistemi. Quando una specie esotica si propaga grazie a fenomeni di riproduzione sessuata o agamica, e la sua diffusione avviene in modo rapido ed incontrollato, viene definita aliena invasiva. Queste entità hanno di conseguenza potenziali impatti negativi sugli ecosistemi invasi. L'importanza dei fenomeni legati all'invasione delle specie aliene è confermata dal crescente interesse mostrato negli ultimi decenni dalla comunità scientifica internazionale con la produzione di un elevato numero di studi (revisioni in Richardson 1998; Lambdon et al. 2008; Lonsdale 1999; Reinhart & Callaway 2006).

Il database DAISIE (Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe) riporta la lista aggiornata delle specie invasive animali e vegetali considerate tra le più dannose per gli ecosistemi acquatici e terrestri. Tradizionalmente gli ecologi hanno volto il proprio interesse allo studio della componente "visibile" e macroscopica degli ecosistemi (specie invasive vegetali ed animali) (Elton 1958). In Europa sono riportati

numerosi esempi di invasioni biologiche con drammatiche conseguenze sui sistemi invasi, con un forte impatto anche sull'opinione pubblica. Per citare alcuni fra i più noti esempi, il gambero d'acqua dolce *Austropotamobius pallipes* è riportato nella lista delle specie in pericolo a causa dell'introduzione di un competitore alloctono proveniente dalla Lousiana (*Procamabrus clarkii*) e di un predatore in grado di trasmettere infezioni (l'oomicete *Aphanomyces astaci*). In mare è nota l'invasione dell'alga *Caulerpa taxifolia* che compete con la fanerogama *Posidonia oceanica*, mentre in ambienti terrestri si registrano invasioni di alberi come *Ailanthus altissima* (originario dell'Asia) o della *Robinia pseudoacacia* (originaria del Nord America) che competono con la flora locale riducendone in maniera drammatica la biodiversità. Al contrario, solo pochissimi studi hanno analizzato le invasioni biologiche da parte di specie microbiche nonostante questa abbia un grosso impatto sulla funzionalità degli ecosistemi (van der Putten et al. 2007). Tale carenza può essere spiegata con la difficoltà tecnica nello studio della componente microbica degli ecosistemi e con la carenza delle conoscenze della biogeografia delle specie microbiche (Green et al. 2008). Infatti, solo recentemente si è accresciuta l'attenzione sull'importanza delle invasioni microbiche da parte di specie opportuniste (Litchman 2010). La maggior parte degli studi condotti su specie microbiche riguardano patogeni umani o vegetali a causa del loro impatto potenzialmente distruttivo. Riportiamo come esempi la diffusione di ceppi multiresistenti di *Staphylococcus aureus* MRSA (Enright et al. 2002) o di batteri appartenenti al gruppo HACEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella* spp e *Kingella* spp.; Meyer 1988) o di contaminanti delle derrate alimentari come *Pseudomonas fluorescens* nella mozzarella (Cantoni et al. 2001). Considerando le specie invasive fungine e da oomiceti (Desprez-Loustau et al. 2007), gli esempi di maggiore rilievo includono le ben note epidemie di *Phytophthora infestans*

dei secoli passati, agente causale della peronospora della patata (Fry 2008) o la diffusione di *Phytophthora cinnamomi* in Australia che ha determinato radicali cambiamenti nelle cenosi forestali con conseguenze sulla funzionalità degli ecosistemi (Weste & Marks 1987; Olson 2006). Nonostante questi esempi notevoli, l'impatto di specie microbiche invasive sulla composizione e funzionalità degli ecosistemi è stata oggetto di pochi studi. Uno dei rari esempi è relativo ai funghi appartenenti al genere *Trichoderma* (Migheli et al. 2009). In particolare, nel caso dei microrganismi opportunisti e decompositori di materia organica non sono disponibili studi sugli effetti di specie microbiche invasive (van der Putten et al. 2007). Allo stato attuale delle conoscenze risulta quindi impossibile predire e quantificare il possibile impatto di specie microbiche invasive a causa della cronica carenza nelle conoscenze ecologiche di base dei processi che controllano il fenomeno delle invasioni. Un'ulteriore considerazione è legata agli ecosistemi acquatici dove la componente microbica è importante per la produzione primaria. In tali sistemi una delle principali cause di mortalità dei microrganismi è legata alla predazione (zooplancton composto da protozoi e nanoflagellati) e alla lisi cellulari determinata da virus (Thingstad 2000). Nelle comunità naturali non disturbate questi fattori sono controllati e controbilanciati dalla capacità intrinseca dei sistemi e dalla diversità delle popolazioni residenti. Nonostante ciò, sono praticamente assenti gli studi che indagano il possibile effetto di specie invasive sulla struttura funzionale delle comunità microbiche.

4.2. Meccanismi di invasione biologica: invasività dei microrganismi e invadibilità delle comunità

Sebbene le invasioni biologiche siano una delle principali cause di riduzione della biodiversità, i meccanismi che le determinano sono poco

noti (Sakai et al. 2001), anche in relazione ai cambiamenti globali climatici e nell'uso del suolo (Ruiz et al. 2000). Numerosi studi teorici, modellistici ed empirici hanno cercato di comprendere le cause delle invasioni di specie vegetali, animali e microbiche. I fattori più rilevanti che influenzano l'invasione di specie esotiche sono:

i. il numero di propaguli che raggiungono il nuovo ambiente (pressione di invasione),

ii. le caratteristiche della specie invasiva (invasività);

iii. la suscettibilità degli ambienti ad essere invasi (invadibilità) (Lonsdale 1999).

Riguardo all'invasività di specie non native, una delle ipotesi più citate nella letteratura scientifica è quella che spiega il successo di tali specie con l'assenza di nemici naturali. Tale ipotesi è comunemente indicata come "natural enemy release hypothesis" (Keane & Crawley 2002). Tale ipotesi si basa sulla possibilità che le specie invasive sono in grado di diffondersi in maniera incontrollata grazie all'assenza (o il ridotto numero) di nemici naturali nel nuovo ambiente.

Al contrario, numerosi studiosi indicano che il successo delle specie esotiche va ricercato anche nella capacità degli ecosistemi di resistere all'invasione stessa. L'invadibilità degli ecosistemi è il risultato netto di numerosi fattori che includono la biodiversità della comunità e il regime di disturbo cui è soggetto l'ecosistema. In tale contesto, un fattore di disturbo di natura antropica è il rilascio di nutrienti, agrofarmaci ed antibiotici di uso umano e veterinario nell'ambiente. L'effetto degli agrofarmaci e degli antibiotici sull'invadibilità delle comunità microbiche non è stato oggetto di studio negli ecosistemi, sebbene sia noto che questi possono favorire la diffusione di patogeni come la Salmonella nelle comunità microbiche legate all'uomo (Croswell et al. 2009). Inoltre, è noto che gli agrofarmaci e gli antibiotici sono in grado di modificare profondamente la composizione, la

funzionalità delle comunità microbiche e potenzialmente anche la loro invadibilità (Fischbach & Walsh 2009).

4.3. Relazione tra biodiversità ed invadibilità delle comunità

Le invasioni biologiche sono considerate la seconda causa nella perdita di biodiversità a scala globale, precedute solo dalla distruzione degli habitat (Williamson 1996). Per di più, gli ecosistemi con maggior diversità sono considerati meno suscettibili alle invasioni da parte di specie esotiche (Hooper et al. 2005). La relazione che lega la diversità delle comunità native alla loro invadibilità non è completamente chiara in quanto solo pochi studi sperimentali hanno comparato l'invadibilità di comunità con differente diversità. Da questo punto di vista le comunità microbiche emergono come sistemi modello di studio ideali grazie alla rapidità di crescita oltre alla possibilità di creare in laboratorio un'ampia gamma di condizioni sperimentali diversificate.

La relazione tra diversità e funzioni ecosistemiche (Hooper et al. 2005) è sicuramente uno degli argomenti di studio di maggior interesse e tra i più citati nell'anno della Biodiversità (2010). Numerosi studi hanno indagato l'insieme dei meccanismi alla base della relazione inversa tra diversità delle comunità e invadibilità. In particolare, comunità più ricche di specie potrebbero ridurre la presenza di nicchie ecologice "vuote" e utilizzare in maniera più efficiente e completa le risorse, riducendo cosi la probabilità di successo degli invasori (Tilman 1999). Tale meccanismo si basa sulla complementarietà nell'utilizzo dello spazio e delle risorse da parte delle specie native. E' anche noto che una maggior biodiversità aumenta la probabilità che in una determinata comunità sia presente una o più specie in grado di limitare la specie invasiva. Tale meccanismo è noto come *sampling effect* (Huston 1997; Tilman 1999). La validità di tale quadro teorico, sebbene testata con successo per i vegetali (es. Duke 2001;

Eisenhauer et al. 2008), non è stata valutata per le comunità microbiche. Infatti, i pochi studi condotti con i microrganismi hanno utilizzato batteri colonizzatori della rizofera (Hodgson et al. 2002) o sistemi acquatici composti da protisti e rotiferi (Jiang & Morin 2005), ma sempre utilizzando comunità iper-semplificate. Queste considerazioni indicano la necessità di studi che focalizzino l'attenzione sulle comunità microbiche nel contesto delle invasioni biologiche.

4.4. Invadibilità delle comunità: ruolo delle disponibilità di risorse e degli stress ambientali

Oltre alla biodiversità, altri fattori ecologici influenzano l'invadibilità delle comunità biologiche. Davis et al. (2000) hanno identificato la fluttuazione delle risorse come uno dei fattori ecologici più importanti nel determinare l'invadibilità degli ecosistemi. Brevemente, una specie invasiva deve avere accesso ad una serie di risorse (es. luce, acqua, nutrienti in forma minerale e carbonio organico per gli eterotrofi) per crescere, riprodursi, diffondersi e quindi divenire invasiva. Conseguentemente, il successo delle specie invasive è tanto più elevato quanto maggiore è l'accessibilità alle risorse limitanti. In presenza di un'intensa competizione interspecifica la disponibilità delle risorse viene ridotta, e assumendo l'intensità di competizione inversamente correlata con l'ammontare di risorse inutilizzate, appare logico identificare i fattori che riducono la competizione come elementi che favoriscono indirettamente le invasioni biologiche. Un incremento nella disponibilità di risorse può derivare da due cause: una riduzione dell'uso da parte delle comunità e/o un incremento negli apporti esogeni alla comunità. L'utilizzo delle risorse può essere ridotto da fattori di stress o disturbo che limitano la capacità delle comunità native di competere con i potenziali invasori. La predazione, la diffusione di epidemie, l'inquinamento da xenobiotici (es. antibiotici) fino ai trattamenti con

agrofarmaci ad ampio spettro negli agro ecosistemi possono ridurre la resistenza delle comunità alle invasioni biologiche. Allo stesso modo, un incremento della disponibilità di risorse legato ad esempio all'eutrofizzazione, carattere ubiquitario degli agro ecosistemi, può rendere un ambiente più suscettibile all'invasione biologica. In base a tale teoria, l'invadibilità di una comunità non è una proprietà statica degli ecosistemi ma bensì dinamica nel tempo in funzione della fluttuazione delle risorse (Davis & Pelsor 2008). A questo punto è interessante notare il parallelismo tra la teoria della fluttuazione delle risorse (Davis et al. 2000) con il fenomeno della fungistasi descritto estensivamente nel Capitolo 3. In entrambi i modelli il sistema considerato diviene invadibile per un determinato periodo di tempo a seguito della presenza di un surplus di risorse determinato da un incremento degli apporti esogeni e/o da una riduzione della capacità di assorbimento del sistema.

In questo contesto è rilevante il potenziale ruolo degli agrofarmaci ad ampio spettro nel rendere le comunità più sensibili alle invasioni biologiche. Secondo la teoria della fluttuazione delle risorse la presenza di molecole tossiche (es. agrofarmaci, antibiotici, etc.) può incrementare la disponibilità locale di risorse danneggiando le comunità locali e quindi la loro capacità di competere in maniera efficace. Questo aspetto può divenire di grande interesse negli ecosistemi terrestri ed in particolare negli agro ecosistemi che sono contemporaneamente soggetti a periodici disturbi e all'apporto esogeno di risorse in quantità eccedenti le necessità dei produttori primari.

In sintesi, nonostante la crescente consapevolezza dell'importanza delle invasioni biologiche di microrganismi opportunisti e patogeni, sono estremamente ridotte le conoscenze relative ai fattori e le condizioni che favoriscono tale fenomeno.

4.5. Obiettivi dello studio

Lo studio aveva come obiettivo generale indagate la resistenza delle comunità microbiche alle invasioni biologiche. In particolare è stata studiata la relazione che lega la diversità microbica, in presenza di fattori di ambientali variabili, con la suscettibilità della comunità microbiche ad essere invase da parte di specie aliene. In questo studio per specie aliene si intendono specie introdotte nel sistema sperimentale ed, ovviamente, tassonomicamente differenti dalla specie che formano le comunità sintetica che devono invadere. A tale fine è stato selezionato l'approccio delle comunità sintetiche utilizzando comunità con diversi livelli di complessità (da 1 fino a 8 specie presenti contemporaneamente) e composte da esclusivamente da funghi. Le specifiche ipotesi che sono state indagate erano: (1) la suscettibilità all'invasione delle comunità si riduce con la diversità microbica?; (2) l'effetto della diversità dipende dalle condizioni ecologiche e dal sistema sperimentale indagato?; (3) la variabilità nel processo di invasione biologica è dipendente dalla diversità microbica?

4.6. Materiali e metodi

4.6.1. Diversità microbica e invasioni biologiche

L'effetto della diversità microbica sulla suscettibilità all'invasione di specie microbiche aliene è stata indagata attraverso una serie di esperimenti condotti con l'approccio delle comunità microbiche sintetiche in condizioni controllate di temperatura ed umidità. La suscettibilità all'invasione è stata sempre valutata quantificando le popolazioni di una specie utilizzata come invasore biologico. Nello specifico è stata selezionato il ceppo M71 di *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. Tale specie è stata selezionata in quanto è descritta come agente di controllo biologico (Raio et al. 2011). Inoltre il ceppo M71 è dotato di specifiche resistenze ad antibiotici (rifampicina; Raio et al. 2011) che ne permette la coltivazione selettiva e quindi la semplice determinazione della popolazione anche in colture microbiche miste.

In dettaglio sono stati effettuati esperimenti che simulassero l'invasione di due compartimenti degli agro ecosistemi:

i. invasione di residui vegetali, nel caso specifico fieno di *Medicago sativa*;

ii. invasione della rizosfera della pianta modello *Lepidium sativum*.

4.6.1.1. Selezione dei microrganismi ed assemblaggio delle comunità sintetiche

I consorzi microbici sono stati allestiti secondo i principi descritti nel Capitolo 2 (i.e. utilizzo di tutte le monocolture nel disegno sperimentale, selezione a caso delle specie per formazione delle comunità sintetiche). In breve, le specie microbiche che andavano a costituire i consorzi sono state prelevate a caso da un pool di otto specie (Tabella 4.1). A partire dal pool di otto specie sono state assemblate a caso dodici comunità fungine a tre livelli

di diversità microbica (1, 2 e 8 specie) (Tabella 4.2). I microcosmi sono stati inoculati mantenendo costante la concentrazione dei propaguli fungini e di cellule batteriche al variare della diversità microbica (10^3 conidi mL-1). L'inoculo fungino è stato ottenuto da colture pure di circa 10 giorni cresciute su PDA. Su tali colture sono stati aggiunti 10 mL di acqua sterile e la superficie frizionata per rimuovere i conidi. La sospensione così ottenuta è stata filtrata, centrifugata e risciacquata tre volte in acqua sterile. Infine, la concentrazione di conidi è stata quantificata tramite emocitometro e successivamente portata a 1 x 10^5 conidi mL^{-1}. L'inoculo è stato effettuando applicando 500 µl delle sospensioni conidiche dopo diluizione finalizzata ad ottenere la concentrazione desiderata che era dipendente dal numero di specie che componevano i consorzi microbici.

n°	Specie	Phylum	Ordine
1	*Aspergillus niger*	Ascomycota	Eurotiales
2	*Aspergillus* sp.	Ascomycota	Eurotiales
3	*Cladosporium cucumerinum*	Ascomycota	Capnodiales
4	*Penicillium restrictum*	Ascomycota	Eurotiales
5	*Penicillium* sp.	Ascomycota	Eurotiales
6	*Trichoderma harzianum*	Ascomycota	Hypocreales
7	*Trichoderma* sp.	Ascomycota	Hypocreales
8	*Umbelopsis ramanniana*	Zygomycota	Mucorales

Tabella 4.1 Elenco delle specie fungine utilizzate per assemblare le comunità sintetiche negli esperimenti volti ad indagare la relazione tra diversità microbica e invasioni biologiche.

In totale, sono state assemblate tredici comunità fungine a tre livelli di diversità microbica (1, 2 e 8 specie) (Tabella 4.2). Per ogni esperimento sono stati allestiti 70 microcosmi (14 combinazioni microbiche x 1 materiali organico x 5 repliche).

Numero di specie	Numero di combinazioni	Numero di repliche identiche	Microcosmi totali
1	8	1	8
2	4	1	4
8	1	2	2
TOTALE	13	-	14

Tipo di microcosmi	Numero di substrati organici	Repliche
14	1	5
	TOTALE	70

Tabella 4.2. Sintesi del disegno sperimentale dell'esperimento volto a indagare la relazione tra la relazione tra diversità microbica e invasioni biologiche. Le specie fungine componenti le comunità sintetiche sono state scelte a caso da un pool di otto specie.

4.6.1.2. Invasione di residui vegetali

I residui vegetali sono una elemento fondamentale per la gestione del ciclo della sostanza organica negli agro ecosistemi (Bonanomi et al. 2011a). Inoltre i residui sono uno dei compartimenti dell'agro-ecosistema dove i microrganismi saprofiti, i patogeni e gli eventuali agenti di controllo interagiscono e competono per le risorse disponibili. Obiettivo di questo esperimento era quindi indagare la capacità di un agente di biocontrollo (ceppo M71 di *P. chlororaphis*) di invadere residui colturali precedentemente inoculati con delle comunità sintetiche con diversità microbica crescente (1, 2 e 8 specie). La lettiera fogliare di erba medica (*Medicago sativa*) è stata selezionato come residuo vegetale in quanto è una delle specie foraggere più diffuse ed è utilizzata come *cover crop* e come coltura da sovescio. Inoltre i residui di *M. sativa* sono caratterizzati da un

elevato contenuto di azoto e zuccheri semplici in grado di sostenere un'intensa attività microbica. Precedenti studi hanno caratterizzato chimicamente tali residui ed hanno dimostrando come questi possano influenzare lo sviluppo dei microrganismi tellurici (Bonanomi et al. 2008; Bonanomi et al. 2011b).

Gli esperimenti sono stati condotti allestendo dei microcosmi in contenitori tipo Magenta. Ognuno contenitore conteneva 50 g di sabbia di quarzo sterile addizionati con acqua sterile. Ogni comunità sintetica è stata trasferita in microcosmi ammendati con 10 mL di una sospensione allo 0.5% di foglie di *Medicago sativa*. A seguito dell'applicazione degli ammendanti organici e delle comunità microbiche i microcosmi sono stati incubati a 24°C. Dopo 3 giorni di incubazione è stato inoculata la specie invasiva. L'inoculo del ceppo M71 è stato effettuato apportato 1 mL di soluzione fisiologica alla concentrazione di 1 x 10^4 cellule mL^{-1}. Dopo ulteriori tre giorni di incubazione la popolazione della specie invasore è stata quantificata tramite diluizioni seriali e conta su piastra su substrato selettivo (LB) ottenuto addizionando antibiotici (rifampicina a 100 ppm). Le piastre di LB sono state incubate a 28 °C per due giorni a cui è seguita la conta delle colonie. I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via in cui la ricchezza di specie (1, 2 e 8 specie) era l'unico fattore sperimentale in analisi.

4.6.1.3. Invasione della rizosfera

La rizosfera è il volume di suolo che circonda le radici, e nel quale lo sviluppo dei microrganismi è stimolato rispetto al suolo circostante. L'esistenza della rizosfera è dipendente dal rilascio attivo dell'apparato radicale delle piante di sostanze organiche di varia natura quali carboidrati, aminoacidi, acidi organici ecc., che sono l'elemento chiave per il mantenimento di una comunità microbica attiva e funzionale che circonda

le radici stesse (Lynch & Whipps 1990; Jones et al. 2004). Nella rizosfera le popolazioni microbiche caratterizzate da un'elevata biodiversità, possono variare da 10 milioni fino ad un miliardo di cellule per grammo di suolo. In particolare, differenti microrganismi come funghi micorrizici e non, batteri, nematodi e protozoi coesistono, ognuno con funzioni specifiche e differenti ma coordinate nel loro complesso, a supportare la crescita e lo sviluppo delle piante (Bais et al. 2006). Altra funzione fondamentale della microflora rizosferica è la protezione dai patogeni tellurici. Tali microrganismi sono riconosciuti come uno dei principali fattori limitanti la produttività negli agro-ecosistemi, ed inoltre sono difficili da controllare anche con le strategie di lotta convenzionali ad elevato impatto ambientale. In quest'ottica, numerosi organismi rizosferici comprendenti funghi come *Trichoderma* spp., e batteri appartenenti ai generi *Bacillus* e *Pseudomonas* sono potenzialmente capaci di controllare i patogeni tellurici. In base a tali considerazioni, obiettivo di questo esperimento era indagare la capacità di un agente di biocontrollo (ceppo M71 di *P. chlororaphis*) di invadere l'ambiente rizosferico inoculato con delle comunità sintetiche con diversità microbica crescente (1, 2 e 8 specie). Come specie vegetale è stato selezionato il crescione comune (*Lepidium sativum*), una specie modello caratterizzata da crescita rapida ed uniforme (Bonanomi et al. 2006).

Gli esperimenti sono stati condotti allestendo dei microcosmi in piastre quadrate (12 x 12 cm) sterili nelle quali erano fatte crescere le plantule di *L. sativum*. Ognuno piastra conteneva 5 semi di *L. sativum* sterilizzati in superficie posti su carta da filtro sterile (Fig. 4.1). Ogni comunità sintetica è stata trasferita nei microcosmi separatamente. A seguito dell'applicazione dell'inoculo microbico i microcosmi sono stati incubati a 24°C. Dopo 3 giorni di incubazione è stato inoculata la specie invasiva. L'inoculo del ceppo M71 è stato effettuato apportato 5 mL di soluzione fisiologica alla concentrazione di 1 x 10^3 cellule mL^{-1}. Dopo

ulteriori sette giorni di incubazione la popolazione della specie invasiva presenti sulle radici di *L. sativum* è stata quantificata tramite diluizioni seriali e conta su piastra su substrato selettivo (LB). Il substrato è stato ottenuto addizionando antibiotici (rifampicina a 100 ppm). Le piastre di LB sono state incubate a 28 °C per due giorni a cui è seguita la conta delle colonie. I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via in cui la ricchezza di specie (1, 2 e 8 specie) era l'unico fattore sperimentale in analisi.

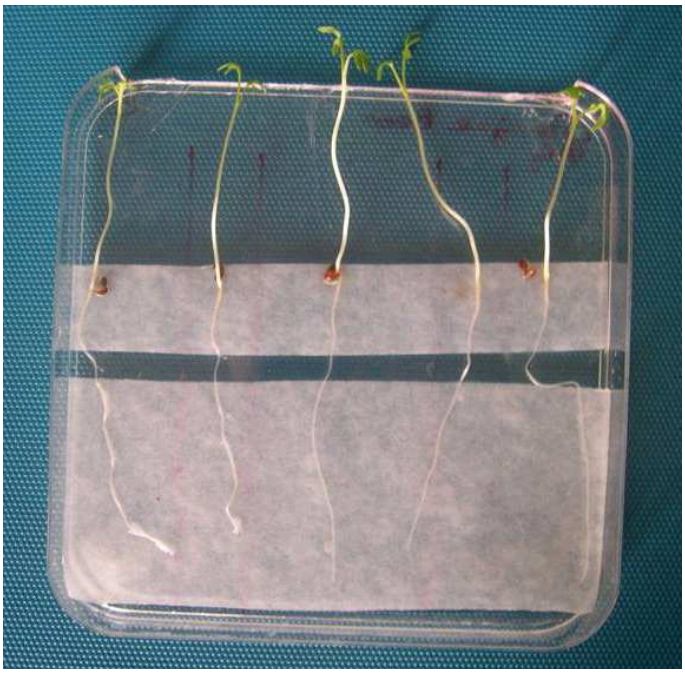

Figura 4.1. Immagine del sistema sperimentale (plantule di *Lepidium sativum* in piastre quadrate sterili) adottato per lo studio della colonizzazione della rizosfera da parte di un agente di controllo biologico (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ceppo M71).

4.7. Risultati

4.7.1. Invasione di residui vegetali

La diversità microbica delle comunità sintetiche inoculate nei microcosmi ha influenzato in maniera altamente significativa la capacità del ceppo M71 di invadere i residui vegetali (ANOVA p <0.001). In altre parole il numero di specie delle comunità sintetiche ha influenzato notevolmente la crescita delle popolazioni di M71 (Fig. 4.2). La media della popolazione del batterio, infatti, diminuisce considerevolmente all'aumentare del numero di specie fungine dei consorzi (Fig. 4.2). La concentrazione media è passata da 10^7 UFC ml^{-1} nelle monocolture a 6,2 x 10^6 UFC ml^{-1} nelle comunità composte da due specie. Dalle conte batteriche effettuate alla differenti diluizioni è risultato che nei consorzi composti da tutte e otto le specie fungine la popolazione di M71 era non rilevabile (Fig. 4.2 e 4.3).

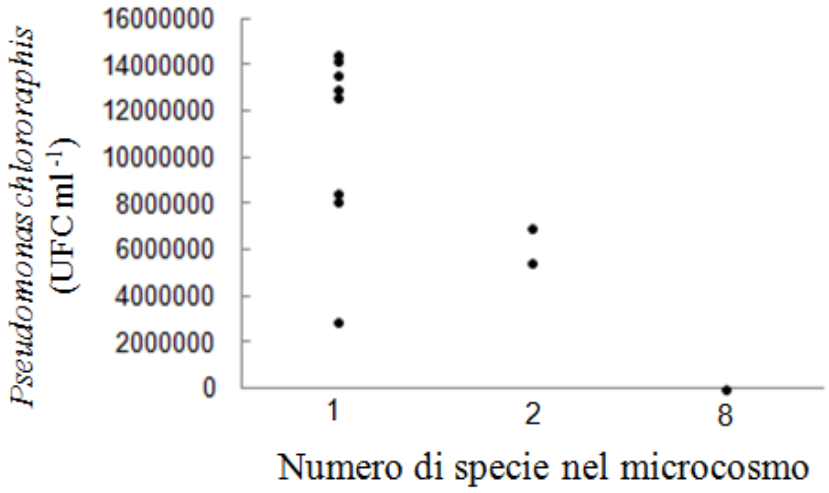

Figura 4.2. Popolazione di *Pseudomonas chlororaphis* ceppo M71 dopo tre giorni di incubazione in microcosmi ammendati con residui fogliari di *Medicago sativa* ed inoculati con comunità sintetiche con diversità microbica crescente.

Inoltre, si nota come oltre ad una diminuzione della popolazione di M71, all'incremento della diversità dei consorzi si rileva una riduzione della

variabilità delle dimensioni delle popolazioni. Infatti, per le comunità composte da due funghi i valori della popolazione di M71 sono più simili tra loro rispetto ai valori ottenuto nelle comunità monospecifiche (Fig. 4.2).

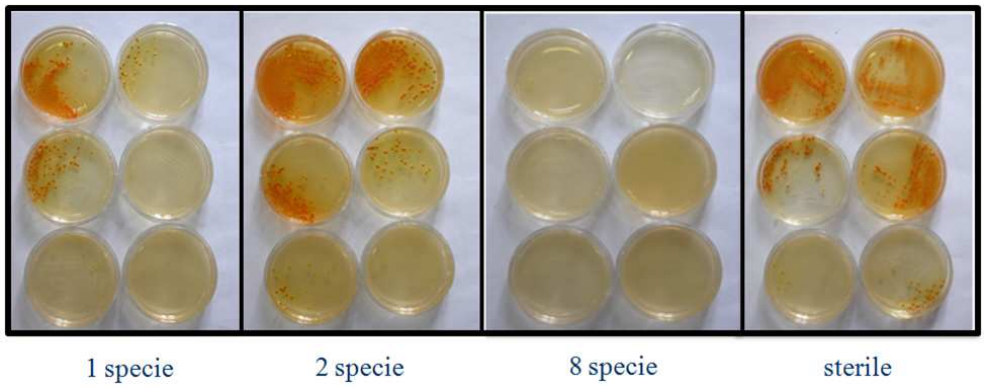

Figura 4.3. Piastre ammendate con rifampicina (100 ppm) ed inoculate con tre diverse diluizioni (decrescente dall'alto verso il basso: 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, rispettivamente) di sospensioni dei microcosmi contenenti l'inoculo fungino e il ceppo M71. Si nota la diminuzione della popolazione di M71 con l'aumento del numero di specie fungine all'interno delle comunità sintetiche. Nell'ultima fila è riportato il controllo dove i microcosmi non erano inoculati con comunità fungine sintetiche ma solo con il ceppo M71.

4.7.2. Invasione della rizosfera

Anche per l'esperimento relativo all'invasione della rizosfera di *L.* sativum, la diversità microbica delle comunità sintetiche ha influenzato in maniera altamente significativa la capacità del ceppo M71 di colonizzare le radici della pianta modello (ANOVA $p < 0.001$). Infatti, nella rizosfera di *L. sativum* la popolazione di M71 si riduceva progressivamente con l'aumentare del numero di specie costituenti le comunità fungine inoculate sulle radici (Fig. 4.4). La media della popolazione passava da $1{,}2 \times 10^{7}$ UFC ml^{-1} in corrispondenza delle monocolture a $8{,}2 \times 10^{5}$ UFC ml^{-1} per le comunità composte da due specie. Anche in questo caso la popolazione di M71 non era rilevabile sulle radici precedentemente inoculate con otto specie fungine contemporaneamente. Infine, anche nei microcosmi

assemblati sulla rizosfera di *Lepidium*, la variabilità dei risultati è risultata inversamente correlata con la ricchezza di specie costituenti i consorzi microbici (Fig. 4.4).

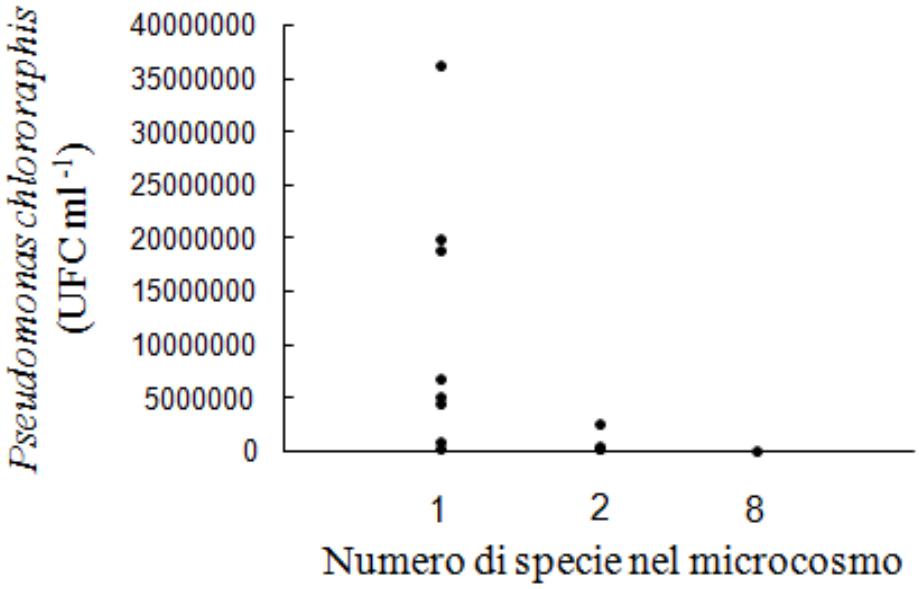

Fig. 4.4. Popolazione di *Pseudomonas chlororaphis* ceppo M71 dopo sette giorni di incubazione su radici di *L. sativum* precedentemente inoculate con comunità sintetiche con diversa microbica crescente.

4.8. Discussioni

Secondo Crawley (1987), una comunità è invadibile quando una specie di nuova introduzione è in grado di aumentare in maniera significativa la propria popolazione. In questo studio, in entrambi i sistemi sperimentali utilizzati, risulta evidente che le comunità sintetiche assemblate si differenziano ampiamente per la loro suscettibilità ad essere invase. Mediamente le monocolture sono risultate molto più invadibili rispetto alle comunità sintetiche costitute da due ma soprattutto da otto specie. E' di particolare importanza che tale risultato è stato rilevato in entrambi i sistemi analizzati (residui vegetali e rizosfera). La progressiva e consistente riduzione dell'invadibilità delle comunità con l'incremento della diversità dei microrganismi residenti è consistente con quanto precedentemente riportato in letteratura sia per sistemi microbici (Hodgson et al. 2002; Matos et al. 2005; Jiang & Morin 2005) che per le piante terrestri (Knops et al. 1999; Duke 2001; Fargione & Tilman 2005; Eisenhauer et al. 2008). Ad esempio, Matos et al. (2005) hanno riportato che la sopravvivenza di *Pseudomonas aeruginosa* nella rizosfera di grano diminuiva in maniera significativa con la diversità delle comunità residenti.

Il presente studio dimostri chiaramente l'esistenza di una relazione negativa tra diversità delle comunità residenti e suscettibilità all'invasione microbica. Comunque è importante rimarcare che gli esperimenti effettuati non forniscono informazioni circa i meccanismi che rendono le comunità a maggior diversità più resistenti all'invasione. Risulta probabile che meccanismi di competizione, mediati dall'utilizzo delle risorse e/o dalla produzione di metaboliti in grado di inibire il ceppo M71, siano alla base dei risultati osservati. Interessante è notare che le comunità costituite da otto specie microbiche, sia nel caso dei residui di erba medica che per la rizosfera di *L. sativum*, hanno fatto rilevare una resistenza all'invasione decisamente superiore alla migliore comunità monospecifica. Questi

suggerisce l'esistenza di un'azione sinergica tra i funghi della comunità sintetica. Tali sinergismi possono emergere quando la nicchia ecologica dei microrganismi è differenziata e quindi complementare nell'utilizzo delle risorse nelle differenti condizioni ambientali. In letteratura nell'ultimo decennio si è sviluppato un acceso dibattito (revisione in Tilman 1999; Hooper et al. 2005) circa i meccanismi determinanti l'effetto della diversità sulle funzioni ecosistemiche. In particolare la diatriba è relativa all'importanza relativa del *sampling effect* (i.e. la maggior probabilità che le comunità miste contengano le specie più performanti) rispetto alla reale complementarietà tra le specie in interazione (*niche complementarity*). Un metodo semplice per testare le due ipotesi è comparare le miglior policolture con le migliori monocolture. Se le migliori monocolture mostrano delle proprietà uguali o superiori alle migliori comunità miste, probabilmente il *sampling effect* è alla base dei risultati osservati (Huston 1997). Al contrario, se le migliori comunità miste mostrano delle proprietà superiori alle migliori monocolture allora il risultato è probabilmente ascrivibile ad una complementarietà funzionale tra le specie presenti nei consorzi (Tilman 1999). I risultati del nostro studio suggeriscono che la complementarietà funzionale tra specie sia predominante nel determinare le relazioni positive tra invadibilità e diversità microbica. Studi futuri saranno necessari per chiarire se tale complementarietà è legata ad un utilizzo complementare delle risorse trofiche o se le interazioni interspecifiche determinano una maggiore e/o differenziata produzione di metaboliti con attività antibiotica (Garbeva & de Boer 2009)

4.9. Referenze citate

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organ-isms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.

Bonanomi G., Sicurezza M., Caporaso S., Esposito A., Mazzoleni S. 2006. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. *New Phytologist* 169: 571-578.

Bonanomi, G., Chiurazzi, M., Caporaso, S., Del Sorbo, G., Moschetti, G., Scala, F., 2008. Comparison of soil solarization with biodegradable materials with other pest management methods and impact on the soil microbial community. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1989-1998.

Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A., 2011a. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Applied Soil Ecology* 47: 184-194.

Bonanomi, G., Antignani V., Barile, E., Lanzotti, V., Scala F., 2011b. Decomposition of *Medicago sativa* residues and soil-borne pathogen diseases. *Journal of Plant Pathology* 93: 57-69.

Cantoni, C., Marchisio, E., Galli, M., 2000. Causa della colorazione blu-verde delle mozzarelle. *Industrie alimentari* 39: 586-588.

Crawley, M.J., 1987. What makes a community invasible? In: Gray, A.J., Crawley, M.J., Edwards, P.J. (eds) Colonization, succession and stability. Blackwell, Oxford, pp 429-453.

Croswell, A., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M. & Salzman, N.H., 2009 Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection *Infection and Immunity* 77: 2741-2753.

Davis, M.A., Grime, J.P., Thompson, K., 2000. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology* 88: 528-534.

Davis, M.A., Pelsor, M., 2008. Experimental support for a resource-based mechanistic model of invasibility *Ecology Letters* 4: 421-428.

Desprez-Loustau, M.L., **Robin, C.,Buée M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sache, I., Rizzo, D., 2007.** The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecological Evolution* 22: 472-480.

Dukes, J.S. 2001. Biodiversity and invasibility in grassland microcosms. *Oecologia* 126: 563-568.

Eisenhauer, N., Milcu A., Sabais, A.C.W., Scheu, S. 2008. Animal ecosystem engineers modulate the diversity-invasibility relationship. *PLoS ONE* 3:e3489.

Elton, C.S., 1958. The Ecology of Invasions by Animals and Plants. London: Methuen.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *PNAS* 99: 7687-7692.

Fishbach, M.A., Walsh, C.T., 2009. Antibiotics for emerging pathogens *Science* 325: 1089-1093.

Fry, W., 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9: 385-402.

Garbeva, P., de Boer, W., 2009. Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. Microbial Ecology 58: 36-46.

Green, J.L., **Bohannan, B.J.M., Whitaker, R.J., 2008.** Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320: 1039-1043.

Hodgson, D.J, Rainey, P.B., Buckling, A., 2002. Mechanisms linking diversity, productivity and invasibility in experimental bacterial

communities. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 269:2277-2283.

Hooper, D.U., Chapin, F.S. III, Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setala, H., Symstad, J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge *Ecological Monographs* 75: 3-35.

Huston, M.A., 1997. Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* 110: 449-460.

Jiang, L., Morin, P.J., 2005. Productivity gradients cause positive diversity–invasibility relationships in microbial communities. *Ecology Letters* 7:1047-1057.

Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163: 459-480.

Keane, R.M., Crawley, M.J., 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis *Trends in Ecological Evolution* 17: 164-170.

Knops, J.M.H., Tilman, D., Haddad, N.M., Naeem, S., Mitchell, C.E., Haarstad, J., Ritchie, M.E., Howe, K.M., Reich, P.B., Siemann, E., Groth, J. 1999. Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundances and diversity. *Ecology Letters* 2: 286-293.

Lambdon, P.W., Pysek, P., Basnou, C., Hejda, M., Arianoutsou, M., Essl, F., Jarosik, V., Pergl., J., Winter, M., Anastasiu, P., Andriopoulos, P., Bazos, I., Brundu, G., Celesti-Grapow, L., Chassot, P., Delipetrou, P., Josefsson, M., Kark, S., Klotz, S., Kokkoris, Y., Kuhn, I., Marchante, H., Perglova, I., Pino, J., Vila, M., Zikos, A., Roy, D., Hulme, P.E., 2008. Alien flora of Europe:

species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs. *Preslia* 80: 101-149.

Litchman, E., 2010. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems *Ecology Letters* 13: 1560-1572.

Lonsdale, W.M., 1999 Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology* 80: 1522-1536.

Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 1-10.

Matos, A., Kerkhof, L., Garland, J.L., 2005. Effects of microbial community diversity on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the wheat rhizosphere. *Microbial Ecology* 49: 257-264.

Meyer, D.J., Gerding, D.N., 1988. Favorable prognosis of patients with prosthetic valve endocarditis caused by gram-negative bacilli of the HACEK group. *American Journal of Medicine* 85: 104-107.

Migheli, Q., Balmas, V., Komoñ-Zelazowska, Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversità and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of Hypocrea/Trichoderma. *Environmental Microbiology* 11: 35-46.

Olson, L.J., 2006. The economics of terrestrial invasive species: a review of the literature, *Agricultural and Resource Economics Review* 35: 178-194.

Pimentel, D., Lach, L. Zuniga, R., Morrison, D., 2000. Environmental and economic cost of nonindigenous species in the United States. *Bioscience* 50:53-65.

Pysek, P., Richardson, D.M., Rejmanek, M., Webster, G.L., Williamson, M., Kirshner, J., 2004. Alien plants in checklist and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* 53: 131-143.

Raio, A., Puopolo, G., Cimmino, A., Danti, R., Della Rocca, G., Evidente, A., 2011. Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M71. *Biological Control* 58: 133-138.

Reinhart, K.O., Callaway, R.M., 2006. Soil biota and invasive plants. *New Phytologist* 170: 445-457.

Richardson, D.M., 1998. Forestry trees as invasive aliens. *Conservation Biology* 12: 18-26.

Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J., 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concept and definitions. *Diversity and Distributions* 6: 93-107.

Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Hug, A., Colwell, R.R., 2000 Worldwide transfer of microorganisms by ships. *Nature* 408: 49-50.

Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecological Systems* 32: 305-332.

Thingstad, T.F., 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of a lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography* 45: 1320-1328.

Tilman, D., 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80:1455-1474.

van der Putten, W.H., **Klironomos, J.N., Wardle, D.A. 2007**. Microbial ecology of biological invasions. *The ISME Journal* 1: 28-37.

Weste, G., **Marks, G.C., 1987.** The Biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian Forests *Annual Review of Phytopathology* 25: 207-229.

Williamson, M.H., 1996. Biological invasions. Chapman & Hall London, UK.