

ALESSANDRA PACINI, CARLO VITI, ROBERTA PASTORELLI

Dinamiche delle comunità batteriche durante il processo di decomposizione della necromassa



Introduzione

Negli ecosistemi forestali, gli alberi morti in piedi, stroncati o sradicati, i frammenti di legno a terra, le radici degli alberi morti e le ceppaie costituiscono la necromassa (FAO, 2004). Questa viene comunemente suddivisa in due principali componenti (Figura 1): le piante morte in piedi e il legno morto a terra.

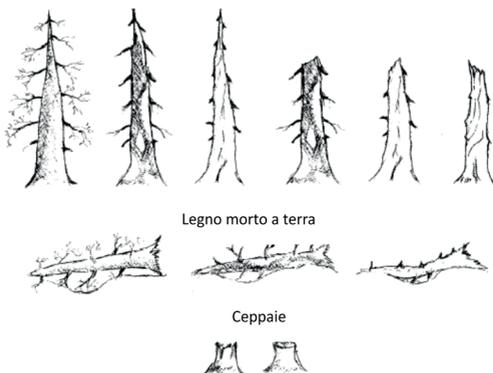


Figura 1 - Classificazione della necromassa (MERGANIČOVÁ *et al.*, 2012).

La necromassa assume numerose funzioni all'interno degli ecosistemi forestali tra le quali quella di costituire una riserva di carbonio (C) immobilizzato e di nutrienti che vengono progressivamente restituiti al suolo. La necromassa inoltre rappresenta un habitat per numerose specie sia animali che vegetali, contribuendo alla conservazione della biodiversità. Aspetti legati alla conservazione e alla protezione del suolo da fenomeni erosivi

sono altrettanto rilevanti ed attribuibili alla presenza della necromassa in bosco.

I tempi di decomposizione della necromassa sono influenzati da numerosi fattori, tra cui i più importanti sono la temperatura, l'umidità, il rapporto C/N, la disponibilità di ossigeno, la qualità chimico-fisica del substrato e la comunità microbica coinvolta. Durante l'avanzamento del processo di decomposizione, la concentrazione delle componenti strutturali della necromassa cambia, determinando una variazione delle condizioni chimiche che rendono il tasso di decomposizione non costante. Un primo momento con alti tassi di decomposizione della frazione prontamente degradabile (zuccheri semplici) è generalmente seguito da un secondo momento in cui vengono attaccati prima alcuni polimeri di peso molecolare minore (amidi, emicellulose, pectine) ed infine i polimeri vegetali più resistenti e recalcitranti come la cellulosa e la lignina (FUKASAWA *et al.*, 2009). Questo andamento riflette una successione microbica di vari taxa di funghi e batteri con diverse abilità metaboliche e quindi con diversa capacità di degradazione (FUKASAWA *et al.*, 2009).

Oltre alla qualità del C organico, un ruolo importante nel processo di decomposizione è svolto dalla disponibilità di nutrienti. Il rapporto C/N nella necromassa tende a decrescere durante la decomposizione a causa dell'aumento di azoto (N) dovuto in parte alla fissazione da parte dei batteri diazotrofi di tale elemento. La percentuale relativa di C spesso

tende a rimanere stabile durante la decomposizione per effetto della perdita di polisaccaridi e del relativo accumulo di lignina (PALVIAINEN *et al.*, 2010).

Durante le prime fasi della decomposizione della necromassa, il contributo della pedofauna (costituita prevalentemente da invertebrati, come per esempio gli insetti xilofagi) è fondamentale per la riduzione del volume dei singoli frammenti legnosi: la frammentazione espone più superficie all'attacco dei microrganismi e favorisce il rimescolamento della componente organica con quella inorganica (HÄTTENSCHWILER *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2010; ULYSHEN, 2016).

I funghi, in particolare i Basidiomiceti e Ascomiceti, sono da sempre considerati i pionieri e gli agenti dominanti su tutti gli altri taxa capaci di degradare i biopolimeri disponibili (PURAHONG *et al.*, 2018). I funghi saprofiti coinvolti nelle prime fasi della decomposizione sono per lo più endofiti, nelle fasi successive subentrano taxa capaci di degradare la cellulosa fino alle fasi finali della decomposizione in cui sono coinvolti Basidiomiceti capaci di degradare la lignina e gli acidi umici (FUKASAWA *et al.*, 2009; VORISKOVA e BALDRIAN, 2013; PURAHONG *et al.*, 2016). Negli ultimi anni è stato dimostrato che anche i batteri riescono a degradare la lignina e a catabolizzare prodotti secondari derivanti dalla incompleta degradazione della stessa da parte dei funghi (BUGG *et al.*, 2011 a,b; PROBST *et al.*, 2018). Ad oggi però, pochi studi hanno riguardato le variazioni della composizione e le dinamiche delle comunità batteriche nell'ambiente naturale durante la decomposizione della necromassa posta a contatto con lettiera e suolo, nonché le interazioni che queste possono avere con la componente fungina (JOHNSTON *et al.*, 2016). La maggior parte dei batteri saprofiti del legno appartiene ai *phyla Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Acidobacteria* (HAGGE *et al.*, 2019). Essi partecipano a tutto il processo degradativo essendo in grado di utilizzare il legno come substrato e agendo con i funghi

attraverso complesse relazioni sinergiche e di competizione (GREAVES, 1971; MERCER; CLAUSEN, 1996; DE BOER *et al.*, 2005; FOLMAN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2014).

Lo scopo del seguente lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze sulla diversità della struttura delle comunità batteriche implicate nel processo di degradazione della necromassa tramite l'uso di mesocosmi allestiti in soprassuoli di pino nero, analizzando il suolo, la lettiera e la necromassa a vari stadi di decomposizione.

Per raggiungere tale obiettivo è stato utilizzato un approccio multidisciplinare che ha previsto la caratterizzazione delle comunità batteriche tramite tecniche molecolari (*Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; PCR-DGGE*) e la valutazione di parametri chimici (contenuto in N totale e in C totale). La tecnica DGGE viene frequentemente utilizzata in ecologia microbica e si basa sulla separazione elettroforetica di frammenti di DNA della stessa dimensione ma con differente composizione in basi azotate (MUYZER *et al.*, 1993). Tale tecnica fornisce dei profili (*fingerprint*) delle comunità microbiche che possono essere utilizzati per identificare differenze sia spaziali che temporali nella struttura delle comunità o per identificare variazioni che occorrono in risposta a perturbazioni ambientali (MUYZER e SMALLA, 1998).

Materiali e metodi

Area di studio

I mesocosmi sono stati allestiti nella foresta peri-urbana di Monte Morello, un complesso collinare e montano situato tra i comuni di Calenzano, Sesto Fiorentino e Vaglia (FI). Il complesso di Monte Morello è costituito da rilievi, la maggior parte dei quali, localizzati intorno a 700 m sopra il livello del mare (s.l.m.) e raggiunge il massimo di altitudine a 934. I suoli si sono formati da formazioni

geologiche del Paleocene e dell'Eocene, composte da un'alternanza di marne calcaree bianche e grigie, scisti argillosi e arenarie calcaree. Il clima è tipicamente mediterraneo con precipitazioni concentrate in autunno e all'inizio della primavera, inverni miti ed estati secche (GIUNTINI *et al.*, 2017). Dai primi anni '80, la piovosità media annua è stata di circa 1003 mm e la temperatura media annua 13,9 °C.

Disegno sperimentale e campionamento

I mesocosmi, costituiti da collari in plastica di misura 30 cm il diametro e 20 cm l'altezza, sono stati posizionati a distanza di 60 cm sulla fila e 100 cm tra le file. Ad ogni mesocosmo, ad eccezione di quelli di controllo, è stato aggiunto in superficie un campione di necromassa di dimensioni standard prelevato da legno di pino nero morto a terra (*lying deadwood*) di diversa classe di decomposizione (Figura 2).



Figura 2 - Mesocosmo con i campioni di necromassa ai vari stadi di decomposizione.

La classe di decomposizione è stata assegnata mediante una valutazione visiva impiegando il sistema a 5-classi proposto da HUNTER (1990) e modificato da PALETO E TOSI (2010) che prende in considerazione la struttura della corteccia, la presenza di piccoli rami, la morbidezza del legno, l'estensione del marciume e lo sviluppo del micelio fungino. Di ciascun mesocosmo

sono state effettuate tre repliche per le cinque classi di decomposizione della necromassa (mesocosmi B, C, D, E, F) e per il controllo (mesocosmi A), per un totale di 18 mesocosmi. La necromassa nei mesocosmi è stata posizionata sopra una rete con maglie di 2 mm così da evitare perdita di materiale durante l'esperimento e non compromettere il contatto con il suolo, la lettiera, la flora e la pedofauna. I campioni di suolo, lettiera e necromassa sono stati raccolti dopo due anni dall'allestimento dei mesocosmi. I suoli sono stati campionati con un carotatore di 5 cm di diametro, alla profondità 0-10 cm o 10-30 cm. I campioni di necromassa sono stati raccolti utilizzando un trapano a batteria (20,4 V) con una punta progettata per rimuovere cilindri di legno di 3 cm di diametro (Figura 3; PASTORELLI *et al.*, 2017).



Figura 3 - Campionamento della necromassa.

I campioni di lettiera sono stati raccolti e successivamente suddivisi in tre diverse frazioni: foglie (L) – materiale indecomposto o leggermente frammentato in cui la sostanza organica appare fresca e lievemente scolorita; materiale frammentato (F) – materiale mediamente frammentato in cui sono riconoscibili miceli fungini e piccole radici; humus (H) – materiale amorfo e degradato in cui non è possibile riconoscere gli elementi che vanno a costituire la sostanza organica. I campioni raccolti di lettiera e necromassa sono stati triturati utilizzando un molino analitico

Fritsch Cutting Mill Pulverisette 15.

Caratteristiche chimiche

Per la determinazione del contenuto totale di carbonio (TC) e azoto (TN) tutti i campioni delle tre diverse frazioni del mesocosmo (suolo, lettiera e necromassa) sono stati prima passati in un setaccio con maglie di 2 mm e successivamente circa 10 g di materiale sono stati omogeneizzati con un mortaio a 0,5 mm. TC e TN sono stati misurati tramite un analizzatore elementare Flash 2000 NC (*Thermo Fisher*) utilizzando capsule di argento contenenti 20 mg di ciascun campione.

Il pH è stato determinato utilizzando un pH-metro a sonda 211 Microprocessor pH Meter (*Hanna Instruments*) miscelando i campioni in acqua distillata secondo le seguenti proporzioni: 20 gr (peso secco) di suolo + 40 ml di acqua; 1 gr (peso secco) di lettiera o necromassa + 20 ml di acqua. Le sospensioni di suolo sono state miscelate e lasciate depositare per 30 min prima di eseguire la misurazione del pH. Le sospensioni di lettiera e necromassa sono state messe in agitatore orbitale per 2 ore a 150 rpm e lasciate depositare 30 min.

Analisi DGGE delle comunità batteriche

Il DNA totale è stato estratto da 200 mg di ciascun campione di suolo, lettiera e necromassa utilizzando il FastDNA Kit for Soil (MP-Bio). Il DNA estratto è stato controllato e quantificato tramite elettroforesi su gel d'agarosio (0,8% p/v). La regione V6-V8 del gene 16S rRNA è stata amplificata, da ciascun campione di DNA estratto, mediante PCR utilizzando i primer 986F e 1401R (NÜBEL *et al.*, 1996). Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 25 µl utilizzando un T100 Thermal Cycler (Biorad) secondo il seguente programma: denaturazione iniziale a 95°C per 3 min; 35 cicli di denaturazione a 95°C per 30 sec, annealing a 55°C

per 30 sec, polimerizzazione a 72°C per 45 sec; polimerizzazione finale a 72°C per 5 min. La miscela di reazione era costituita da: Flexi PCR buffer 1X, Promega, MgCl₂ 1.5 mM, deossinucleotidi trifosfati dNTPs 250 µM, primer 400 nM ciascuno, siero albumina bovina BSA 400 µgr, GoTaq®Flexi DNA polimerasi (Promega) 5U, 2 µl di DNA stampo.

Le analisi DGGE sono state eseguite utilizzando un gel di poliacrilamide (6% v/v) contenente un gradiente di denaturazione lineare (45% - 65%) ottenuto con urea (7 M) e formammide (40% v/v). La corsa elettroforetica è stata eseguita a 60°C e voltaggio (75 V) costante, utilizzando il sistema Dcode (Biorad). Al termine dell'elettroforesi i gel sono stati colorati con SYBR Gold (Molecular Probes) e le immagini digitalizzate utilizzando l'apparato ChemiDoc (Biorad).

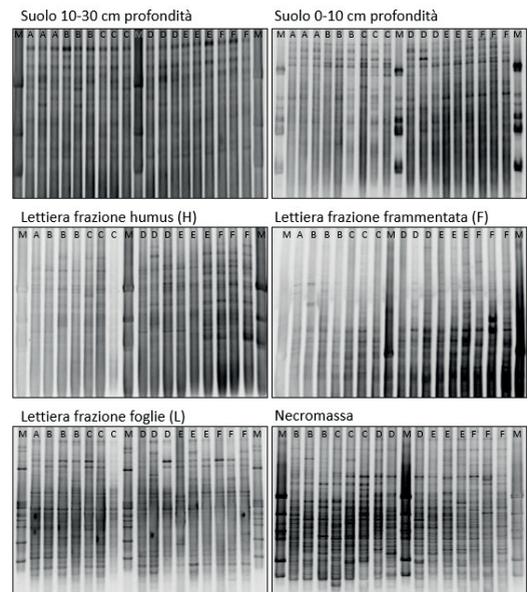


Figura 4 - Profili DGGE relativi alle frazioni dei mesocosmi. Nelle figure, "M" corrisponde al marker, le lettere "A", "B", "C", "D", "E", "F" indicano il mesocosmo di appartenenza del campione analizzato.

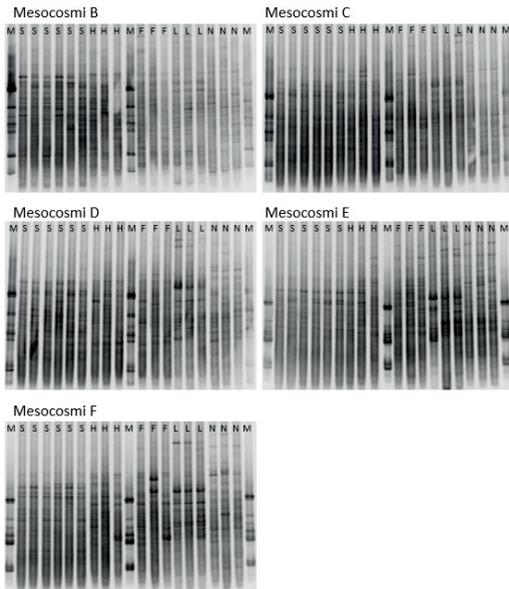


Figura 5 - Profili DGGE relativi ai campioni che compongono ciascun mesocosmo. Nelle figure, "M" corrisponde al marker, "S" al suolo (0-10 cm e 10-30 cm), "H" alla frazione unificata della lettiera, "F" alla frazione frammentata della lettiera, "L" alla frazione delle foglie intere della lettiera, "N" alla necromassa.

Analisi statistica

I profili DGGE 16S rDNA sono stati analizzati con Gel Compar II Software v 4.6 (Applied Maths). Per ciascun profilo DGGE sono stati calcolati i valori di abbondanza di specie (Richness) e l'indice di diversità di Shannon seguendo la procedura descritta da PASTORELLI *et al.* (2011). La struttura delle comunità batteriche dei differenti campioni di suolo, lettiera e/o necromassa è stata determinata tenendo conto della presenza/assenza delle bande in ciascun profilo elettroforetico. Le matrici binarie così ottenute da ciascun gel DGGE sono state esportate nel software PAST (<http://folk.uio.no/hammer/past>) tramite il quale è stato possibile effettuare l'analisi di Multidimensional Scaling (MDS) e l'analisi di similarità (ANOSIM) utilizzando in entrambi i casi il coefficiente di similarità di Dice. Le differenze tra le medie dei valori di pH, contenuto di C e N, Richness e indice di

Shannon diversity sono state statisticamente validate tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tuckey ($P < 0,05$).

Risultati e discussione

Analisi delle caratteristiche chimiche

I risultati relativi alla caratterizzazione chimica (TC, TN, rapporto C/N e pH) delle frazioni dei mesocosmi (suolo, lettiera e necromassa) sono riportati nella Tabella 1. All'interno di ciascuna frazione presa in esame (suolo, lettiera e necromassa) non si osservano differenze statisticamente significative del contenuto percentuale di N e C o del pH. Complessivamente, tra le frazioni di suolo, lettiera e necromassa, si assiste ad una diminuzione del rapporto C/N passando dalla necromassa al suolo a profondità 10-30 cm. Questa avviene a seguito del progressivo calo del contenuto relativo di TC dovuto alla degradazione delle frazioni carboniose del substrato, compresa la cellulosa, da parte dei microrganismi, contemporaneamente all'aumento del contenuto relativo di TN riscontrabile fino alla frazione unificata della lettiera ed attribuibile all'azione dei batteri azotofissatori e all'immobilizzazione dello stesso elemento nella biomassa microbica (PETRILLO *et al.*, 2015; STRUKELJ *et al.*, 2013).

Il rapporto C/N dei campioni di necromassa non ha evidenziato variazioni significative con l'aumentare della classe di decomposizione, in contrasto con quanto riportato da HOPPE *et al.* (2015) in studi analoghi su faggio e abete rosso condotti nelle Alpi sveve, nel sud-ovest della Germania, dove sono stati registrati valori decrescenti del rapporto C/N al crescere della classe di decomposizione. Dalle analisi dei risultati emerge che i valori percentuali di TC e TN variano maggiormente per effetto della frazione di appartenenza piuttosto che per effetto del campione di necromassa di diversa classe

di decomposizione posizionato nei relativi mesocosmi. Il pH tende ad aumentare passando dalla necromassa al suolo a profondità 10-30 cm.

a diverse Unità Tassonomiche Operative (OTU). L'analisi della varianza ANOVA e il test post-hoc di Tuckey degli indici di Richness e Shannon diversity ottenuti per

Frazione	Mesocosmo	N %	C %	C/N	pH
Necromassa	B	0,38 (0,36)	48,01 (0,50)	128,37 (47,65)	4,03 (0,41)
Necromassa	C	0,43 (0,11)	51,09 (3,61)	124,66 (35,68)	4,17 (0,25)
Necromassa	D	0,52 (0,09)	48,21 (0,76)	94,90 (14,92)	3,99 (0,12)
Necromassa	E	0,48 (0,06)	48,08 (0,30)	101,66 (12,96)	4,12 (0,22)
Necromassa	F	0,66 (0,29)	51,41 (3,15)	93,98 (56,51)	4,96 (0,37)
Lettieria - L	A	0,84	48,95	58,52	5,70
Lettieria - L	B	0,82 (0,13)	47,89 (1,25)	59,19 (8,91)	5,40 (0,60)
Lettieria - L	C	0,86 (0,05)	47,69 (1,85)	56,13 (5,89)	5,60 (0,44)
Lettieria - L	D	0,86 (0,07)	47,89 (1,02)	55,83 (4,14)	5,58 (0,26)
Lettieria - L	E	0,79 (0,15)	44,38 (6,15)	57,55 (15,35)	5,45 (0,48)
Lettieria - L	F	0,88 (0,02)	48,59 (2,11)	55,10 (3,01)	5,17 (0,15)
Lettieria - F	A	1,12	43,77	39,23	6,00
Lettieria - F	B	1,03 (0,12)	37,93 (4,02)	37,03 (3,70)	6,20 (0,29)
Lettieria - F	C	0,99 (0,14)	39,55 (2,00)	40,34 (4,11)	5,86 (0,30)
Lettieria - F	D	0,96 (0,10)	43,21 (2,96)	45,17 (2,91)	5,50 (0,18)
Lettieria - F	E	0,91 (0,13)	44,64 (1,91)	49,27 (4,86)	5,21 (0,47)
Lettieria - F	F	0,89 (0,17)	45,52 (5,01)	52,45 (10,28)	5,47 (0,16)
Lettieria - H	A	0,79	15,20	19,13	6,35
Lettieria - H	B	1,20 (0,28)	23,68 (7,88)	19,42 (1,76)	5,95 (0,63)
Lettieria - H	C	1,11 (0,26)	24,54 (8,95)	21,67 (2,59)	6,19 (0,21)
Lettieria - H	D	1,08 (0,45)	25,92 (15,28)	23,03 (3,86)	6,35 (0,28)
Lettieria - H	E	1,17 (0,44)	30,41 (10,08)	26,73 (7,20)	5,75 (0,44)
Lettieria - H	F	1,09 (0,29)	33,47 (7,72)	31,26 (4,18)	5,61 (0,31)
Suolo 0-10 cm	A	0,45 (0,07)	5,16 (1,83)	11,29 (2,30)	6,93 (0,25)
Suolo 0-10 cm	B	0,42 (0,02)	4,89 (0,85)	11,82 (2,67)	6,75 (0,41)
Suolo 0-10 cm	C	0,46 (0,05)	4,98 (1,37)	10,81 (1,82)	6,73 (0,57)
Suolo 0-10 cm	D	0,41 (0,03)	5,23 (2,63)	12,24 (4,53)	6,52 (0,56)
Suolo 0-10 cm	E	0,37 (0,05)	3,94 (1,28)	10,58 (2,09)	6,70 (0,20)
Suolo 0-10 cm	F	0,47 (0,11)	6,27 (2,32)	12,96 (1,60)	6,68 (0,47)
Suolo 10-30 cm	A	0,30 (0,03)	2,33 (0,88)	7,59 (2,27)	7,09 (0,15)
Suolo 10-30 cm	B	0,29 (0,03)	2,45 (0,46)	8,31 (1,14)	6,97 (0,54)
Suolo 10-30 cm	C	0,33 (0,02)	2,57 (0,46)	7,84 (0,91)	6,55 (0,27)
Suolo 10-30 cm	D	0,27 (0,03)	2,13 (0,53)	7,82 (2,03)	6,81 (0,50)
Suolo 10-30 cm	E	0,31 (0,01)	2,60 (0,64)	8,35 (1,80)	6,86 (0,23)
Suolo 10-30 cm	F	0,32 (0,04)	2,60 (0,53)	8,10 (0,71)	6,98 (0,61)

Tabella 1 - Contenuto di N totale e C totale, espressi in valore percentuale (N% e C%), rapporto C/N e pH (valori medi e deviazione standard in parentesi). I campioni sono identificati in base alla classe di decomposizione della necromassa aggiunta al mesocosmo al momento dell'allestimento dei mesocosmi.

Analisi delle comunità microbiche

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Le corse DGGE degli ampliconi sono riportate nelle Figure 4 e 5. I profili elettroforetici ottenuti presentano un discreto numero di bande corrispondenti

non hanno evidenziato nessuna differenza significativa in base alla diversa classe di decomposizione della necromassa al momento dell'allestimento dei mesocosmi per nessuna delle frazioni prese in esame (necromassa, lettiera, suolo) (Tabella 2).

I valori più alti di entrambi gli indici di diversità sono stati registrati nei campioni di necromassa seguiti dai campioni della frazione L della lettiera e dello strato più superficiale del suolo. I nostri risultati sono in contrasto con quanto affermato in recenti studi effettuati sulla diversità delle comunità batteriche nel legno in decomposizione, in cui si sostiene che la

diversità batterica sia nettamente inferiore nella necromassa rispetto a quella che si registra nel suolo (HERVÉ *et al.* 2014; SUN *et al.* 2014). Inoltre, i valori di Richness relativi alla necromassa non presentano differenze significative in base alla diversa classe di decomposizione, in contrasto con quanto si ritrova in HOPPE *et al.* (2015).

La frazione F della lettiera è l'unica per cui sono state rilevate differenze significative in relazione all'aggiunta di necromassa a differenti livelli di decomposizione, la quale ha portato ad un incremento della biodiversità (indice di Shannon diversity) nelle frazioni sottostanti, passando dalla classe 1 alla

classe 5. Questo risultato potrebbe indicare che la frazione F della lettiera è più sensibile alla colonizzazione da parte delle comunità batteriche trattandosi di materiale frammentato posto in stretto contatto con le altre frazioni della lettiera (L e H), la necromassa e il suolo, e quindi presentando una maggiore diversità delle OTU.

Analisi Multi Dimensional Scaling (MDS) e ANOSIM

In Figura 6 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi MDS condotta sui profili elettroforetici DGGE 16S rDNA delle diverse frazioni che compongono ciascun mesocosmo (necromassa, lettiera e suolo). Mediante l'analisi MDS si ottengono delle rappresentazioni grafiche in uno spazio

bidimensionale in cui la distanza tra i simboli (campioni) riflette il grado di similarità/dissimilarità nella composizione delle comunità batteriche dei vari campioni di necromassa, lettiera o suolo. Più la struttura delle comunità batteriche prese in esame sarà simile, minore sarà la distanza tra i simboli. Dall'analisi MDS emerge che le comunità batteriche della necromassa tendono sempre a diversificarsi dalle comunità delle frazioni della lettiera e del suolo, indipendentemente dalla classe di decomposizione del campione di necromassa. La composizione in OTU delle comunità batteriche delle frazioni L, F e H della lettiera risultano molto simili tra di loro e separate da quelle del suolo e della necromassa. Le comunità batteriche dei campioni di suolo alle due diverse profondità (0-10 cm e 10-30 cm) risultano simili tra loro e sempre distinte dalle comunità batteriche della necromassa e della lettiera, ad esclusione del mesocosmo D in cui le comunità del suolo si differenziano maggiormente tra di loro e si raggruppano con quelle della lettiera in particolare con quelle della frazione H. In Figura

7 vengono confrontate in ciascun grafico le stesse frazioni dei diversi mesocosmi. I risultati mostrano che la composizione in OTU si differenzia nettamente nelle prime 3 classi di decomposizione (rispettivamente mesocosmi B, C e D) della necromassa, in accordo con quanto emerso da studi precedenti condotti in Germania su necromassa di *Fagus sylvatica* L. e *Picea*

Frazione	Mesocosmo	Richness	Shannon diversity
Necromassa	B	42,23 (4,16)	3,70 (0,10)
Necromassa	C	41,67 (2,52)	3,69 (0,07)
Necromassa	D	37,67 (1,53)	3,59 (0,04)
Necromassa	E	42,00 (2,00)	3,71 (0,05)
Necromassa	F	43,00 (5,20)	3,73 (0,12)
Lettieria - L	A	34,00	3,46
Lettieria - L	B	35,33 (4,51)	3,53 (0,12)
Lettieria - L	C	34,67 (4,16)	3,49 (0,16)
Lettieria - L	D	36,00 (3,00)	3,55 (0,10)
Lettieria - L	E	32,67 (5,03)	3,45 (0,15)
Lettieria - L	F	32,67 (1,15)	3,46 (0,03)
Lettieria - F	A	9,00	2,196 b
Lettieria - F	B	14,67 (1,15)	2,66 (0,06) ab
Lettieria - F	C	16,00 (3,61)	2,71 (0,23) ab
Lettieria - F	D	17,33 (5,86)	2,77 (0,32) ab
Lettieria - F	E	21,00 (1,00)	2,98 (0,02) a
Lettieria - F	F	18,33 (1,53)	2,86 (0,09) ab
Lettieria - H	A	19,00	2,92
Lettieria - H	B	15,67 (0,58)	2,74 (0,05)
Lettieria - H	C	19,50 (3,54)	2,95 (0,18)
Lettieria - H	D	21,00 (4,58)	3,00 (0,21)
Lettieria - H	E	19,67 (6,03)	2,93 (0,31)
Lettieria - H	F	21,67 (2,52)	3,03 (0,11)
Suolo 0-10 cm	A	30,00 (1,00)	3,37 (0,03)
Suolo 0-10 cm	B	29,33 (4,04)	3,34 (0,12)
Suolo 0-10 cm	C	29,00 (2,65)	3,33 (0,08)
Suolo 0-10 cm	D	29,67 (2,08)	3,34 (0,08)
Suolo 0-10 cm	E	31,67 (3,06)	3,41 (0,09)
Suolo 0-10 cm	F	31,67 (1,53)	3,42 (0,04)
Suolo 10-30 cm	A	17,00 (1,73)	2,81 (0,09)
Suolo 10-30 cm	B	19,33 (1,53)	2,94 (0,08)
Suolo 10-30 cm	C	19,67 (2,52)	2,95 (0,13)
Suolo 10-30 cm	D	16,67 (3,51)	2,78 (0,22)
Suolo 10-30 cm	E	16,67 (1,53)	2,79 (0,09)
Suolo 10-30 cm	F	15,00 (1,00)	2,69 (0,75)

Tabella 2 - Indici di Richness e Shannon diversity (valori medi e deviazione standard in parentesi). I campioni sono identificati in base alla classe di decomposizione della necromassa aggiunta al mesocosmo al momento dell'allestimento dei mesocosmi. Analisi della varianza ANOVA e test post-hoc di Tuckey eseguita sui campioni suddivisi in base alla diversa frazione.

Nelle classi di decomposizione 4 e 5 (rispettivamente mesocosmi E ed F) i profili DGGE non formano gruppi coerenti con la classe di appartenenza. Nonostante le comunità batteriche non cambino significativamente in quanto a numero di specie e diversità, la loro composizione in OTU varia con il progredire della decomposizione del legno. Questo suggerisce che i cambiamenti chimico-fisici che avvengono durante la decomposizione del substrato, possano influenzare significativamente le comunità batteriche della necromassa selezionando i taxa che meglio si adattano alle nuove condizioni (PASTORELLI *et al.*, 2017). Contrariamente, nei mesocosmi E e F le condizioni che si sono sviluppate nel periodo di incubazione sembrano aver influenzato in maniera analoga la composizione in OTU delle comunità batteriche presenti, con la selezione di taxa filogeneticamente più vicini. Nel caso delle tre frazioni della lettiera (foglie - L, materiale frammentato - F e humus - H), i relativi profili DGGE non formano gruppi coerenti in funzione del mesocosmo di appartenenza né della frazione stessa di appartenenza, dimostrando la maggiore suscettibilità di questo substrato alla colonizzazione da parte di diverse comunità microbiche. Nella frazione del suolo a profondità 0-10 cm le comunità batteriche appartenenti ai mesocosmi A, B e C, formano gruppi distinti tra loro e rispetto a tutti gli altri campioni che formano un raggruppamento unico. Nel grafico relativo ai campioni di suolo della profondità 10-30 cm le comunità non si distinguono sulla base del mesocosmo di appartenenza ad eccezione delle comunità del mesocosmo A.

L'analisi ANOSIM è stata condotta raggruppando i profili DGGE in base alle diverse classi di decomposizione della necromassa al momento dell'allestimento dei mesocosmi e sottoponendoli ad analisi per frazione (necromassa, lettiera, suolo) (Tabella 3) o per classe di decomposizione (Tabella 4). L'analisi ANOSIM è una procedura non parametrica che consente

di verificare se le differenze tra due o più gruppi di osservazioni multivariate sono significative o meno (CLARK, 1993). Essa fornisce dei valori di R che permettono di verificare se l'effetto frazione o classe di decomposizione della necromassa abbia influenzato la composizione della comunità batterica. I valori di R sono compresi tra 0 e 1, dove R = 0 indica che non ci sono differenze tra i gruppi mentre più il valore di R si avvicina a 1, maggiore sarà la similarità tra le repliche di un gruppo (variabilità intra-gruppo) rispetto a quella con i campioni degli altri gruppi (variabilità tra-gruppi). Nel nostro caso i valori di R più bassi sono stati ottenuti sui campioni divisi per frazione (lettiera, suolo) rispetto a quelli ottenuti conducendo l'analisi ANOSIM sui profili elettroforetici DGGE raggruppati per classe di decomposizione della necromassa al momento dell'allestimento dei mesocosmi. Questo risultato conferma quanto ottenuto analizzando i risultati tramite MDS, suggerendo nuovamente che la frazione ha un effetto maggiore e più significativo rispetto alla classe di decomposizione della necromassa nel diversificare le comunità batteriche presenti.

Frazione	R	P
Necromassa	0,528	0,0005
Lettiera - L	0,136	0,133
Lettiera - F	0,313	0,012
Lettiera - H	0,077	0,276
Suolo 0-10 cm	0,621	0,0001
Suolo 10-30 cm	0,156	0,088

Tabella 3 - Risultati dell'analisi ANOSIM ottenuti dai DGGE eseguiti sui campioni divisi per frazione (necromassa, lettiera, suolo) e raggruppando i profili in base alla classe di decomposizione della necromassa al momento dell'allestimento dei mesocosmi.

Mesocosmo	R	P
B	0,839	0,0001
C	0,847	0,0001
D	0,768	0,0001
E	0,841	0,0001
F	0,841	0,0001

Tabella 4 - Risultati dell'analisi ANOSIM ottenuti dai DGGE eseguiti sui campioni divisi per classe di decomposizione della necromassa al momento dell'allestimento dei mesocosmi e raggruppando i profili in base alla frazione (necromassa, lettiera, suolo).

Conclusioni

L'analisi globale dei risultati ottenuti, relativi alla durata dell'esperimento (2 anni), ha mostrato che le comunità batteriche dei campioni di suolo, lettiera e necromassa si sono differenziate maggiormente per effetto della frazione di appartenenza (necromassa, lettiera o suolo), piuttosto che per effetto della presenza dei campioni di necromassa a diversi stadi di decomposizione all'interno dei mesocosmi. Dalla caratterizzazione chimica e da quella microbica non sono emersi dati statisticamente significativi che consentano di correlare la classe di decomposizione della necromassa alle dinamiche delle comunità batteriche che interessano le frazioni prese in esame, probabilmente a causa della breve durata del periodo di allestimento dei mesocosmi di soli due anni.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato finanziato dal programma LIFE nel contesto del Progetto FoResMit (LIFE14/CCM/IT/905 – *Recovery of degraded coniferous Forests for environmental sustainability Restoration and climate change Mitigation*).

BIBIOGRAFIA

- BUGG T. D., AHMAD M., HARDIMAN E. M., RAHMANPOUR R., 2011 - *Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi*. Natural Product Report 28: 1883-1896.
- BUGG T. D., AHMAD M., HARDIMAN E. M. SINGH R., 2011 - *The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation*. Current Opinion in Biotechnology 22: 394-400.
- CLARK K. R., 1993 - *Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure*. Australian Journal of Ecology 18: 117-143.
- CLAUSEN C. A., 1996. - *Bacterial associations with decaying wood: a review*. International Biodeterioration & Biodegradation 37: 101-7.
- DE BOER W., FOLMAN L. B., SUMMERBELL R. C., BODDY L., 2005 - *Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development*. FEMS Microbiological Review 29: 795-811.
- FAO 2004 – *Global Forest Resources Assessment Update 2005: Terms and Definitions*. Working Papers 83/E, Forest Resources Assessment Programme, Rome.
- FOLMAN L. B., KLEIN GUNNEWIEK P. J., BODDY L., DE BOER W., 2008 - *Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil*. FEMS Microbiology Ecology 2008, 63:181-91.
- FUKASAWA Y., OSONO T., TAKEDA H., 2009 - *Dynamics of physicochemical properties and occurrence of fungal fruit bodies during decomposition of coarse woody debris of Fagus crenata*. Journal of Forest Research 14: 20-29.
- GIUNTINI F., DE MEO I., GRAZIANI A., CANTIANI P., PALETTO A., 2017 - *Stima del legno morto in rimboschimenti di pino nero (Pinus nigra J.F. Arnold) in Toscana: confronto tra casi studio*. Dendronatura 38: 19-28.
- GREAVES H., 1971 - *The bacterial factor in wood decay*. Wood Science and Technology 5: 6-16.
- HAGGE J., BÄSSLER C., GRUPPE A., HOPPE B., KELLNER H., KRAH F.S., MÜLLER J., SEIBOLD S., STENGEL E., & THORN S., (2019). *Bark coverage shifts assembly processes of microbial decomposer communities in dead wood*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 286:20 19 174.
- HÄTTENSCHWILER S., TIUNOV A. V., SCHEU S., 2005 - *Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36: 191-218.
- HERVÉ V., LE ROUX X., UROZ S., GELHAYE E., FREY-KLETT P., 2014 - *Diversity and structure of bacterial communities associated with Phanerochaete chrysosporium during wood decay*. Environmental Microbiology 16: 2238-51.
- HOPPE B., KRUGER K., KAHL T., ARNSTADT T., BUSCOT F., BAUHUS J., WUBET T., 2015 - *A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of Fagus sylvatica and Picea abies*. Scientific Reports; 5:9456.
- HUNTER M.L., 1990 – *Wildlife, forests and forestry*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ: 370.
- JOHNSTON S. R., BODDY L., WEIGHTMAN A. J., 2016 - *Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi*. FEMS Microbiology Ecology 92: 179.
- MERGANIČOVÁ K., MERGANIČ J., SVOBODA M., BAČE R., ŠEBEŇ V., 2012 - *Deadwood in forest ecosystems*. In: Blanco J.A., Lo Y.H. (Eds) Forest Ecosystems – More than Just Trees, InTech Book: 81–108.
- MOLL J., KELLNER H., LEONHARDT S., STENGEL E., DAHL A., BÄSSLER C., BUSCOT F., HOFRICHTER M., HOPPE B., 2018. *Bacteria inhabiting deadwood of 13 tree species are heterogeneously distributed between sapwood and heartwood*. Environmental Microbiology 20: 3744-3756.
- MUYZER G., DE WAAL E. C., UITTERLINDEN A. G., 1993 - *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied

Environmental Microbiology 59: 695-700.

MUYZER G., SMALLA K., 1998 - *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

NÜBEL U., ENGELEN B., FELSKA A., SNAIRDR J., WIESHUBER A., AMANN R. I., LUDWIG W., BACKHAUS H., 1996 - *Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis*. Journal Bacteriology 178: 5636-5643.

PALETTO A., TOSI V., 2010 - *Deadwood density variation with decay class in seven tree species of the Italian Alps*. Scandinavian Journal of Forest Research, 25: 164-173.

PALVIAINEN M., FINÉR L., LIHO R., SHOROHVA E., KAPITSA E., VANHA-MAJAMAN I., 2010 - *Carbon and nitrogen release from decomposing Scots pine, Norway Spruce and silver birch stumps*. Forest Ecology and Management 259: 390-398.

PASTORELLI R., LANDI S., TRABELSI D., PICCOLO R., MENGONI A., BAZZICALUPO M., PAGLIAI M., 2011 - *Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities*. Applied Soil Ecology 49: 46-58.

PASTORELLI R., AGNELLI A. E., DE MEO I., GRAZIANI A., PALETTO A., LAGOMARSINO A., 2017 - *Analysis of microbial diversity and greenhouse gas production of decaying pine logs*. Forests 8: 224

PETRILLO M., CHERUBINI P., SARTORI G., ABIVEN S., ASCHER J., BERTOLDI D., CAMIN F., BARBERO A., LARCHER R., EGLI M., 2015 - *Decomposition of Norway spruce and European larch coarse woody debris (CWD) in relation to different elevation and exposure in an Alpine setting*. iForest- 9: 154-164.

PROBST M., GÓMEZ-BRANDÓN M., BARDELLI T., EGLI M., INSAM H., ASCHER-JENULL J., 2018. *Bacterial communities of decaying Norway spruce follow distinct slope exposure and time-dependent trajectories*. Environmental Microbiology. 20: 3657-3670.

PURAHONG W., WUBET T., LENTENDU G., SCHLOTTER M., PECYNA M. J., KAPTURSKA D., HOFRICHTER M., KRUGER D., BUSCOT F., 2016 - *Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition*. Molecular Ecology 25: 4059-4074.

PURAHONG W., WUBET T., LENTENDU G., HOPPE B., JARIYAVIDYANONT K., ARNSTADT T., BABER K., OTTO P., KELLNER H., HOFRICHTER M., BAUHUS J., WEISSER W. W., KRÜGER D., SCHULZE E. D., KAHL T., BUSCOT F., 2018. *Determinants of deadwood-inhabiting fungal communities in temperate forests: molecular evidence from a large scale deadwood decomposition experiment*. Frontiers in Microbiology. 9: 2120.

SONG F., FAN X., SONG R., 2010 - *Review of mixed forest litter decomposition researches*. Acta Ecologica Sinica 30: 221-225.

STRUKELJ M., BRAIS S., QUIDEAU S. A., ANGERS V. A., KEBLI H., DRAPEAU P., OH S. W., 2013 - *Chemical transformations in downed logs and snags of mixed boreal species during decomposition*. Canadian Journal of Forest Research 43:

785-798.

SUN H., TERHONEN E., KASANEN R., ASIEGBU F. O., 2014 - *Diversity and community structure of primary wood-inhabiting bacteria in boreal forest*. Geomicrobiology Journal 31: 315-324.

ULYSHEN M. D., 2016 - *Wood decomposition ad influenced by invertebrates*. Biological Reviews 91: 70-85.

VORISKOVA J., BALDRIAN P., 2013. *Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes*. ISME Journal 7: 477-486.

Alessandra Pacini

Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI),
Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine
24, 50144 Firenze, 055 2755921,
E-mail: alessandra.pacini2@stud.unifi.it.

Carlo Viti

Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI),
Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine
24, 50144 Firenze, 055 2755921,
E-mail: carlo.viti@unifi.it.

Roberta Pastorelli

Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente,
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi
dell'Economia Agraria (CREA-AA), via di Lanciola
12/A, 50125 Firenze, 055 2492247,
E-mail: roberta.pastorelli@crea.gov.it.

PAROLE CHIAVE: necromassa, batteri, *Pinus nigra*.

RIASSUNTO

La necromassa è una componente importante degli ecosistemi forestali in quanto ad essa viene attribuito un ruolo chiave nei cicli biogeochimici degli elementi e nella conservazione della biodiversità. Tali funzioni vengono esplicate attraverso una serie di trasformazioni fisico-chimiche che il legno morto subisce ad opera di agenti biotici ed abiotici. Tra gli agenti biotici il ruolo dei funghi nella decomposizione del legno è ampiamente riconosciuto ma ben poco si sa sul ruolo dei batteri. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare la struttura e le dinamiche nelle comunità

batteriche in campioni di suolo, lettiera e necromassa a vari stadi di decomposizione, provenienti da mesocosmi allestiti nei soprassuoli di pino nero (*Pinus nigra* Arnold ssp. *nigra*) presenti sulle pendici di Monte Morello (FI), mediante un approccio multidisciplinare che ha previsto la determinazione delle caratteristiche chimiche (pH, contenuto totale di carbonio e azoto) e la caratterizzazione delle comunità batteriche associate (tramite la tecnica Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE). I risultati hanno evidenziato che lo stadio di decomposizione della necromassa non influisce in maniera significativa sui parametri chimici analizzati nonostante siano emerse delle tendenze come l'incremento del contenuto di azoto totale. La caratterizzazione delle comunità microbiche ha evidenziato dinamiche molto complesse nelle comunità microbiche presenti nelle frazioni analizzate di suolo, lettiera e necromassa. In particolare, la composizione in Unità Tassonomiche Operative (OTU) delle comunità batteriche della necromassa varia significativamente in base ai diversi stadi di decomposizione, tuttavia non emerge una correlazione significativa tra classe di decomposizione del campione di necromassa e composizione in OTU delle comunità batteriche di lettiera o suolo.

correlation between deadwood decay class and bacterial community composition associated to the underlying fractions of litter and soil.

KEY WORDS *deadwood, bacteria, Pinus nigra.*

ABSTRACT

Deadwood is an important component of forest ecosystems playing a key role in nutrients, biogeochemical cycles, biodiversity and soil preservation. These functions are provided thanks to physical and chemical changes of the deadwood carried out by biotic and abiotic factors. Between the biotic factors, fungi are considered the major deadwood decomposers but far less is known about the role of bacteria during the decay process. The aim of present work is to increase knowledge on bacterial communities involved in deadwood degradation by analyzing samples of soil, litter, and deadwood at different decay stages. The samples were collected from mesocosms set up in a black pine (*Pinus nigra* Arnold ssp. *nigra*) forest, in a specific area of Monte Morello (FI). Samples were analyzed by a multidisciplinary approach defining their chemical parameters (pH, total nitrogen and carbon contents), and characterizing the structure of bacterial communities linked to deadwood decay by using the Polymerase chain reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) technique. The obtained results pointed out that the chemical parameters are not significantly influenced by deadwood decay class even if some trends were observed, like the increase of total nitrogen content. The characterization of the bacterial communities highlighted very complex and different dynamics between the analyzed fractions. In particular, the composition in Operative Taxonomic Units (OTU) varies considerably inside the deadwood fractions at their different decay stages. Still, there's no significant