



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Tesi di laurea:

**Studio degli indicatori precoci di perdita di
resilienza nel biofilm di costa rocciosa**

Candidata:

Silvia Chemello

Relatori:

Prof. Lisandro Benedetti-Cecchi
Dott. Luca Rindi

Anno accademico 2014-2015

Indice

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE	2
1.1. <i>Regime shift</i>	2
1.2. Indicatori precoci di perdita di resilienza e “ <i>Critical Slowing Down</i> ”	5
1.3. Evidenze sperimentali	8
1.4. Sistema di studio: il microfitobenthos epilitico	11
1.5. Scopo della tesi	13
2. MATERIALI E METODI	14
2.1. Sito di studio	14
2.2. Disegno di campionamento	15
2.3. Raccolta dati	19
2.4. Analisi dei dati	22
2.4.1. Effetto del riscaldamento	22
2.4.2. Effetto sulla resilienza del sistema	23
2.4.3. Indicatori precoci di perdita di resilienza	24
3. RISULTATI	25
3.1. Effetto del riscaldamento	25
3.2. Effetto sulla resilienza del sistema	29
3.3. Indicatori precoci di perdita di resilienza	30
3.3.1. Indicatori temporali	30
3.3.2. Indicatori spaziali	32
4. DISCUSSIONE	35

RIASSUNTO

Graduali cambiamenti delle condizioni ambientali (es. aumento dei nutrienti, perdita di habitat, riduzione della biodiversità) possono condurre un ecosistema fino a una soglia critica (“*tipping point*”), oltre la quale l’ecosistema transita in uno stato alternativo. Anticipare tali transizioni critiche è difficile, poiché la variabile di risposta del sistema manifesta solo lievi cambiamenti prima che il sistema transiti nello stato alternativo. Recenti studi teorici hanno proposto l’utilizzo d’indicatori precoci, basati sul fenomeno del “*Critical Slowing Down*” (CSD) per ottenere informazioni riguardo alla prossimità del sistema al *tipping point*. Il CSD prevede un declino della capacità di un sistema di rispondere alle perturbazioni mano a mano che esso si avvicina al *tipping point*. Recenti esperimenti con microrganismi (cianobatteri o lieviti), condotti in condizioni controllate di laboratorio, hanno fornito evidenza sperimentale a supporto del CSD. Scopo della presente tesi è stato quello di estendere questo test sperimentale e di valutare gli indicatori precoci in un ecosistema di costa rocciosa, il microfitobenthos epilitico o biofilm. In tale lavoro di tesi è stata valutata l’ipotesi secondo cui la capacità di recupero del biofilm da piccole perturbazioni (piccole rimozioni di biomassa) dovrebbe diminuire lungo un gradiente di perturbazione (incremento di temperatura). Tale studio ha permesso inoltre di valutare se gli indicatori diretti proposti per anticipare le transizioni critiche, quali l’aumento di autocorrelazione e di varianza, si comportano come previsto dalla teoria in condizioni naturali. Per testare tali ipotesi è stato allestito un esperimento manipolativo nella località di Castiglioncello (Rosignano Marittimo). Nell’autunno del 2014 sono state installate nel sito di studio delle mattonelle di arenaria, nella porzione di costa compresa tra gli 0,2 e 0,3 m sopra il livello medio di bassa marea. Tali mattonelle sono state esposte alla colonizzazione naturale da parte del biofilm e sono state utilizzate, una volta terminato il processo di colonizzazione, come unità per la manipolazione sperimentale. L’innalzamento della temperatura dell’aria è stato ottenuto mediante l’utilizzo di camere a riscaldamento passivo fatte di Plexiglas®, mediante il quale sono stati ottenuti tre livelli di temperatura: Naturale, Riscaldamento moderato e Riscaldamento elevato. I risultati evidenziano come l’aumento medio di temperatura abbia effettivamente alterato le dinamiche temporali del biofilm. Tale effetto può essere dovuto al fatto che l’esposizione ad elevate temperature abbia sottoposto il biofilm a uno stress fisiologico tale da diminuirne il tasso di crescita. Inoltre, dall’analisi degli indicatori di perdita di resilienza, non è emerso alcun effetto significativo del trattamento di riscaldamento. Contrariamente agli indicatori indiretti, il tempo di recupero in seguito alla piccola perturbazione ha mostrato un aumento significativo lungo il gradiente crescente di temperatura. In conclusione, nonostante l’aumento di temperatura di temperatura non abbia portato il biofilm al collasso, i risultati mostrano come leggeri innalzamenti nella temperatura possano indurre notevoli cambiamenti in comunità che, come il biofilm, vivono in prossimità dei loro limiti di tolleranza. Inoltre, il tempo di recupero in seguito ad una piccola perturbazione risulta, rispetto agli indicatori indiretti, l’indicatore più robusto nel segnalare l’avvicinamento di un sistema ad una soglia critica.

1. INTRODUZIONE

1.1 *Regime shift*

Le condizioni esterne ad un ecosistema come la temperatura, l'apporto di nutrienti e la biodiversità presente cambiano gradualmente nel corso del tempo. Gli ecosistemi, tuttavia, non rispondono in maniera univoca a tali cambiamenti gradualmente. Alcuni ecosistemi mostrano una risposta graduale e continua al variare delle condizioni (Fig.1a). Altri possono rimanere inerti per un certo intervallo di condizioni, finché non raggiungono un valore critico oltre le quali esibiscono una transizione verso uno stato degradato (Fig.1b). Infine, esiste una terza situazione in cui la curva di risposta dell'ecosistema al variare delle condizioni assume una forma a S (Fig.1c). Tale andamento ha profonde implicazioni per la risposta che il sistema può mostrare al cambiare delle condizioni.

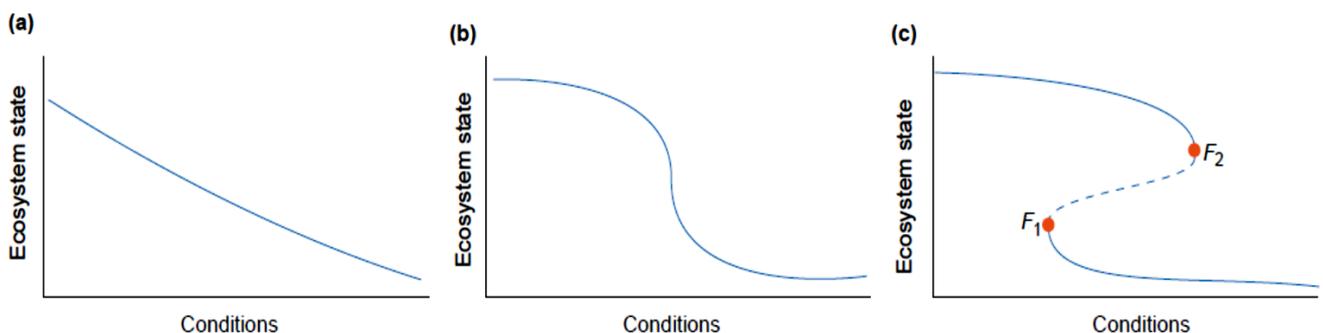


Figura 1. Differenti modalità con cui un ecosistema può rispondere a cambiamenti nelle condizioni. Anche se sistemi dinamici possono rispondere linearmente ai cambiamenti esterni (a), essi possono, a volte, cambiare radicalmente quando le condizioni si avvicinano ad un livello critico (b) o avere più di un singolo stato stabile per un *range* di condizioni (c) (tratto da Scheffer & Carpenter, 2003).

Quando un ecosistema si trova sul ramo superiore della curva per transitare nel ramo inferiore dovrà andare incontro ad una “transizione critica” (o “*regime shift*”), la quale implica un drastico e repentino cambiamento nella variabile di risposta del sistema (Scheffer *et al.*, 2001). Quest’ultima tipologia di transizione è la più drammatica, poiché, una volta avvenuta la transizione, per ripristinare lo stato originario del sistema sarà necessario riportare le condizioni a un valore inferiore rispetto al valore cui è avvenuta la transizione (definito *tipping point*, F_2 in Fig.1c). Tale fenomeno, il quale prende il nome d’isteresi, ha profonde implicazioni dal punto di vista ecologico, poiché maggiore è il grado d’isteresi, maggiore sarà lo sforzo necessario a ripristinare il sistema. Un drammatico esempio di *regime shift* è la transizione da popolamenti dominati da coralli a popolamenti dominati da macroalghe a causa della diminuzione di erbivori (pesci e ricci) e l’aumento di nutrienti (Done, 1991; Knowlton, 1992; Hughes, 1994; McCook, 1999). Un altro esempio di *regime shift* è costituito dalla trasformazione della vegetazione di zone aride in deserto, un processo innescato dall’aumento della temperatura atmosferica come conseguenza del riscaldamento globale (Dublin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2000).

La resilienza è un’importante caratteristica dei sistemi che possono presentare stati alternativi. Holling (1973) introdusse per la prima volta nella letteratura ecologica questo termine per indicare la massima entità del disturbo che può essere assorbita da un sistema senza che esso transiti nello stato alternativo.

Il concetto di resilienza è rappresentabile mediante un diagramma “*ball-in-a-cup*” (Scheffer *et al.*, 2003) (Fig.2). Le valli rappresentano i bacini di attrazione (definiti come l’insieme di condizioni

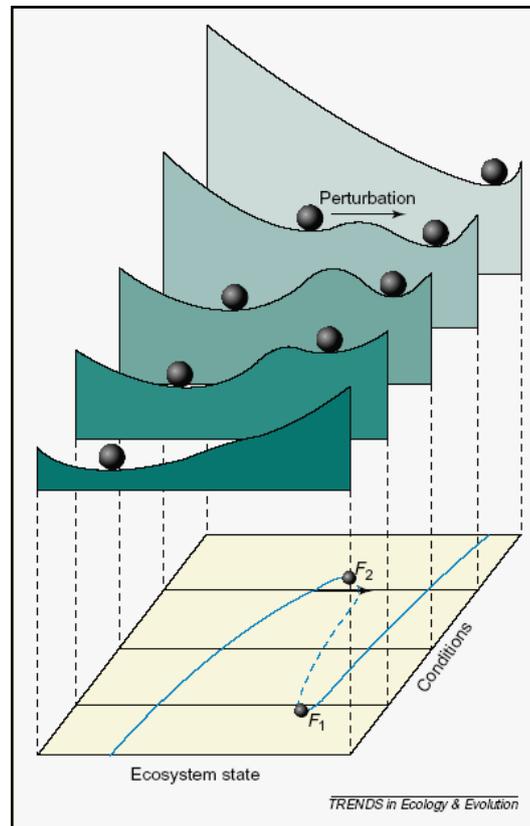


Figura 2. Diagramma di stabilità che illustra come le condizioni esterne possono influire sulla resilienza di ecosistemi con stati stabili multipli. Il piano in basso mostra la curva illustrata nella Fig. 1c. Il diagramma di stabilità rappresenta gli equilibri e i loro bacini d’attrazione sotto differenti condizioni (tratto da Scheffer & Carpenter, 2003).

che definiscono ogni stato) dei due stati alternativi dell’ecosistema, mentre la sfera rappresenta lo stato dell’ecosistema. La cima della collina corrisponde, invece, all’equilibrio instabile e divide le due valli. La sfera tenderà a collocarsi sul fondo del bacino di attrazione e a rimanere stabile. In questa rappresentazione la resilienza è quantificabile facendo riferimento alla profondità e alla pendenza delle pareti dei singoli bacini. Quanto maggiori saranno la profondità e la ripidezza del

bacino, tanto più grande potrà essere la perturbazione che il sistema è in grado di assorbire senza passare nell'altro bacino (van Nes & Scheffer, 2007).

1.2 Indicatori precoci di perdita di resilienza e “*Critical Slowing Down*”

Numerosi ecosistemi possono andare incontro a cambiamenti repentini, i quali comportano transizioni a stati degradati che possono perdurare per lunghi intervalli di tempo (Biggs *et al.*, 2009). I *regime shift*, alterando profondamente gli ecosistemi e quindi anche risorse e servizi forniti da questi, possono avere pesanti ripercussioni sociali e sul benessere umano (Rocha *et al.*, 2015). Inoltre, una volta avvenuta la transizione, il ripristino delle condizioni originarie di un ecosistema può risultare impossibile o richiedere un notevole investimento economico (Folke *et al.*, 2005).

Prevedere i *regime shift* è spesso molto difficile poiché lo stato del sistema può mostrare solo lievi variazioni prima di raggiungere il *tipping point* (van Nes & Scheffer, 2007; Biggs *et al.*, 2009). Inoltre, i modelli matematici riguardanti sistemi complessi non sono in grado di fornire stime accurate della posizione di un *tipping point* (Scheffer *et al.*, 2009). Tali limitazioni hanno determinato la ricerca di approcci alternativi: uno di questi prevede l'applicazione del fenomeno del “*Critical Slowing Down*” (CSD) come indicatore della prossimità di un sistema a una soglia critica (Scheffer *et al.*, 2012). Il CSD è una proprietà generica comune a molti sistemi complessi, definito come il decremento nel tasso di recupero che avviene quando il sistema si avvicina ad una transizione (van Nes & Scheffer, 2007). Il fenomeno del CSD implica che mentre un sistema si avvicina al *tipping point*, il suo bacino d'attrazione si restringa, provocando un aumento del tempo di recupero da piccole perturbazioni. Studi teorici evidenziano come la diminuzione nel tasso di recupero inizi lontano dal *tipping point*, decrescendo in maniera graduale fino a raggiungere lo zero in corrispondenza del punto critico (Scheffer *et al.*, 2009). Le principali conseguenze del CSD sono,

inoltre, un aumento dell'autocorrelazione e della varianza nella modalità di distribuzione delle fluttuazioni della variabile di stato del sistema. Durante la fase di avvicinamento a una soglia critica il sistema perde progressivamente la capacità di rispondere alle perturbazioni: in particolare, il valore della variabile di stato in un dato istante tenderà ad essere maggiormente simile al valore assunto dalla variabile nell'istante precedente. Tale aumento della "memoria del sistema" può essere misurata stimando l'autocorrelazione a *lag 1* (Dakos *et al.*, 2008). A questo si aggiunge un aumento della varianza: esso si deve all'aumento delle fluttuazioni del sistema attorno allo stato stabile, legato al rallentamento nei tassi di recupero vicino a una transizione (Dakos *et al.*, 2012). In linea di principio quindi, all'approssimarsi del *tipping point*, il CSD riduce progressivamente la capacità di un sistema di seguire le fluttuazioni stocastiche, i cui effetti si accumuleranno con un conseguente aumento della varianza (Scheffer *et al.*, 2009). In definitiva, il fenomeno del CSD individua tre possibili indicatori precoci identificabili nelle dinamiche di un sistema che si avvicina ad una transizione (Fig.3): diminuzione del tasso di recupero da perturbazioni anche piccole, incremento dell'autocorrelazione e aumento della varianza (Scheffer *et al.*, 2009).

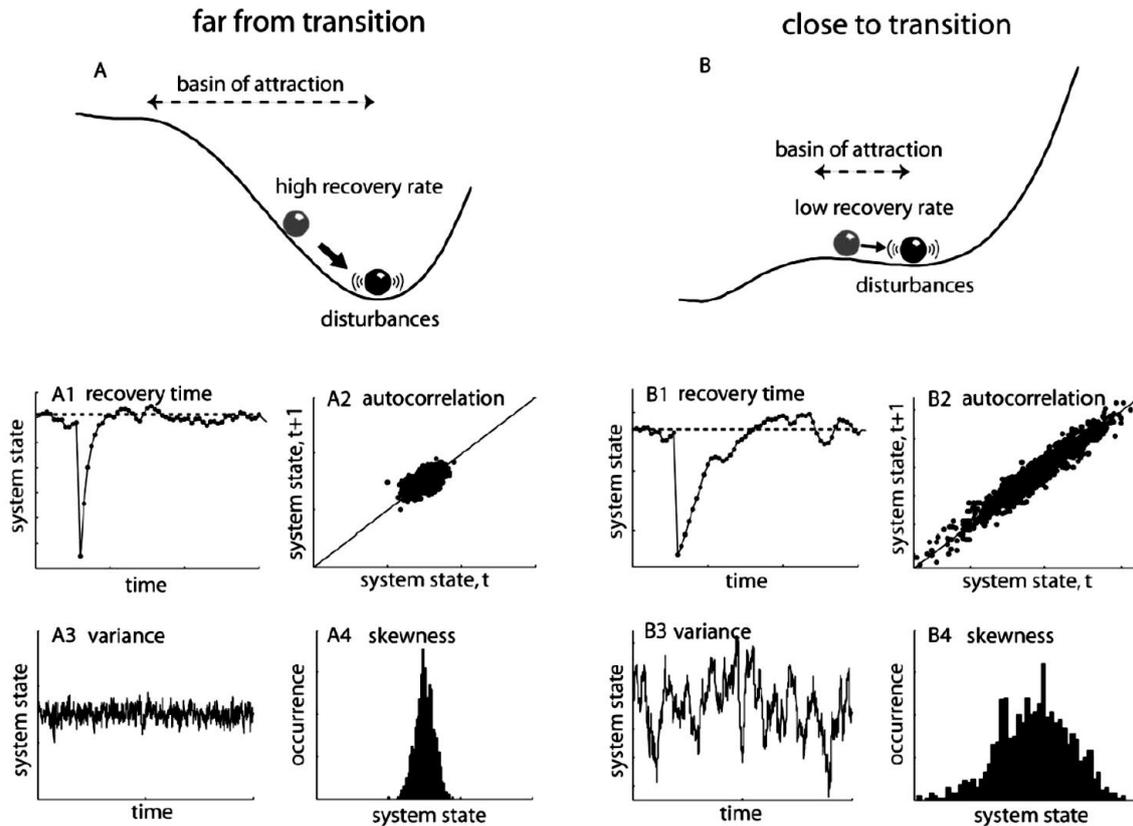


Figura 3. Conseguenze della perdita di resilienza sul bacino di attrazione e sulle modalità di distribuzione delle fluttuazioni temporali della variabile di stato del sistema. A) lontano dalla transizione lo stato del sistema staziona in un ampio bacino d'attrazione. Le piccole perturbazioni sono smorzate dagli elevati tassi di recupero. Ciò comporta che il tempo di recupero da un disturbo è breve (A1); monitorando lo stato del sistema nel tempo, la serie temporale è caratterizzata da bassa correlazione tra valori successivi (A2), bassa varianza (A3), e bassa *skewness* (A4). B) vicino alla transizione il bacino d'attrazione si riduce e può diventare asimmetrico. Piccole perturbazioni possono aumentare la possibilità di transizione ad uno stato alternativo e non sono più attenuate efficacemente come risultato del basso tasso di recupero. Il tempo di recupero da un disturbo è adesso lungo (*critical slowing down*; B1) e la serie temporale è caratterizzata da elevata correlazione tra valori successivi (B2), elevata varianza (B3) e alta *skewness* (B4 (tratto da Dakos *et al.*, 2011).

La vicinanza ad una transizione critica può essere annunciata da cambiamenti nella distribuzione delle fluttuazioni della variabile di stato, i quali non sono causati dal fenomeno di CSD. Uno di questi è l'aumento del grado di asimmetria (*skewness*) della distribuzione delle osservazioni. Tale fenomeno è provocato dal fatto che, in prossimità di una transizione il bacino d'attrazione diviene

asimmetrico e ciò implica che il sistema occuperà per un tempo maggiore la parte più appiattita del bacino (Scheffer *et al.*, 2009; Dakos *et al.*, 2011).

Un altro fenomeno che può essere osservato vicino ad una transizione è il *flickering*, ovvero la probabilità che le perturbazioni stocastiche possano temporaneamente spostare il sistema avanti e indietro tra i due bacini quando esso si trova all'interno della regione di bistabilità. Tale fenomeno può essere considerato un indicatore precoce, poiché il sistema potrebbe transire in maniera definitiva ad uno stato alternativo se le condizioni lo dovessero spingere oltre la soglia critica (Scheffer *et al.*, 2009).

Tali indicatori precoci sono stati valutati perlopiù su serie temporali e hanno ottenuto un grande successo in letteratura, ma possiedono alcuni svantaggi, primo fra tutti il fatto che la loro stima necessita serie temporali lunghe e con una buona risoluzione (Dakos *et al.*, 2010; Kefi *et al.*, 2014). Recenti studi teorici hanno quindi proposto come alternativa agli indicatori temporali l'utilizzo di indicatori basati su dati spaziali. Dakos *et al.* (2010) si concentra sulla correlazione spaziale come indicatore precoce, comparandone l'efficienza rispetto alla correlazione temporale, mentre lo studio di Guttal & Jayapraksh (2009) propone invece la varianza e la *skewness* spaziale come indicatori precoci di perdita di resilienza. Contenendo potenzialmente più informazioni rispetto al singolo dato temporale, i dati spaziali potrebbero permettere la stima di indicatori più robusti rispetto agli indicatori temporali (Guttal & Jayapraksh, 2009).

1.3 Evidenze sperimentali

Prevedere il potenziale collasso di un ecosistema utilizzando gli indicatori precoci di perdita di resilienza è un obiettivo d'interesse primario ai fini della conservazione e gestione degli ecosistemi (Biggs *et al.*, 2009; Scheffer *et al.*, 2009).

Sebbene vi sia un crescente interesse da parte della comunità scientifica per gli indicatori di perdita di resilienza, gli studi che hanno valutato le loro prestazioni sono al momento limitati. Inoltre, gran parte degli esperimenti ecologici sul “*Critical Slowing Down*” sono stato effettuati in laboratorio e su singole popolazioni (Drake & Blaine, 2010; Dai *et al.*, 2012; Veraart *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013).

Drake e Blaine (2010) hanno comparato le dinamiche temporali di popolazioni di *Daphnia magna* mantenute in condizioni di carenza alimentare con quelle di popolazioni di controllo, mostrando come le popolazioni di controllo si stabilizzavano mentre le altre andavano incontro a estinzione dopo un periodo di transizione caratterizzato da ampie fluttuazioni in abbondanza. La soglia critica che demarcava il cambiamento nella dinamica delle popolazioni (cioè l’inizio del collasso verso l’estinzione) si manifestava 271-316 giorni dopo il mantenimento in condizioni di ridotto regime alimentare. Il calcolo degli indicatori precoci di *regime shift* indicava un aumento significativo di autocorrelazione e varianza nelle popolazioni mantenute a regime alimentare ridotto rispetto ai controlli, a partire da circa 110 giorni prima dell’inizio del collasso verso l’estinzione.

Veraart *et al.* (2012) hanno esaminato la risposta di popolazioni di cianobatteri a diluizioni del mezzo di coltura lungo un gradiente d’intensità luminosa crescente. Le diluizioni erano di entità limitata e quindi causavano modeste riduzioni della densità delle popolazioni, mentre il gradiente d’intensità luminosa costituiva un progressivo degrado delle condizioni ambientali causando foto inibizione. Questo è stato il primo esperimento che ha incluso i trattamenti necessari a valutare in modo diretto la teoria alla base del “*Critical Slowing Down*”. I trattamenti includevano infatti un gradiente di condizioni ambientali progressivamente meno adatte alla persistenza delle popolazioni, incrociato con piccole perturbazioni dalle quali, secondo la teoria, le popolazioni dovevano recuperare rapidamente quando lontane dal *tipping point* e meno facilmente in prossimità della soglia critica verso l’estinzione. I risultati di Veraart *et al.* (2012) indicavano chiaramente questo fenomeno evidenziando l’aumento dell’autocorrelazione (ma non della varianza) come indicatore precoce efficace per anticipare il *regime shift* nel loro sistema sperimentale.

Dai *et al.* (2012) hanno condotto un esperimento simile a quello di Veraart e colleghi su popolazioni di lievito, utilizzando però diluizioni crescenti per generare il gradiente di degrado ambientale e uno shock salino come piccola perturbazione. La novità dello studio di Dai *et al.* (2012) è il fatto di aver incluso nell'esperimento numerosi livelli di diluizione e svariate repliche per livello così da caratterizzare in maniera esaustiva le dinamiche di popolazione nelle diverse condizioni sperimentali. Ciò ha permesso agli autori di descrivere le dinamiche non lineari delle popolazioni, individuare con precisione il *tipping point* e di evidenziare la presenza d'isteresi nel sistema. Tecnicamente, gli autori hanno ottenuto una mappa sperimentale del diagramma di biforcazione che separa i punti di equilibrio stabile da quelli di equilibrio non stabile delle popolazioni, oltre i quali avviene il collasso e l'estinzione. Anche in questo esperimento gli indicatori precoci di *regime shift* si sono comportati come previsto dalla teoria, con un aumento della varianza e dell'autocorrelazione all'avvicinarsi del *tipping point*.

Carpenter e collaboratori (2011) hanno ottenuto evidenze a favore degli indicatori precoci di *regime shift* in un esperimento di aggiunta di predatori apicali (esemplari adulti di *Micropterus salmoides*) in un lago del Minnesota. L'esperimento esaminava come l'effetto dei predatori alterava la rete trofica del lago, influenzando l'abbondanza di pesci che si nutrivano di zoo- e fito-plancton (planctivori) e delle stesse componenti zoo- e fito-planctoniche. In seguito al primo evento riproduttivo il lago si popolava di giovanili del predatore apicale che però si nutrivano sia di plancton che d'invertebrati bentonici, passando poi a una dieta a base di pesci planctivori in fase adulta. L'aggiunta dei predatori induceva quindi forti oscillazioni temporali nelle abbondanze dei popolamenti planctonici e ittici del lago. A questa fase di transizione seguiva il *regime shift*, caratterizzato dalla dominanza dei predatori a scapito dei pesci planctivori. Conducendo misurazioni a elevata frequenza temporale delle fluttuazioni di abbondanza di pesci planctivori e zooplancton e della concentrazione di clorofilla (una misura indiretta di abbondanza fitoplanctonica), Carpenter e colleghi (2011) hanno mostrato come la resilienza del sistema diminuisse nella fase di transizione e come gli indicatori precoci associati a queste variabili

fornissero indicazioni di un incipiente *regime shift* un anno prima che questo realmente si verificasse. Questi eventi non venivano osservati, invece, in un lago limitrofo usato come controllo, dove i predatori apicali erano stati lasciati a densità naturale.

Un test sperimentale condotto direttamente sul campo è stato svolto da Benedetti-Cecchi *et al.* (2015): in questo caso gli autori hanno testato la validità degli indicatori precoci su un sistema naturale d'intertidale roccioso dominato dall'alga *Cystoseira amentacea*, la quale è stata esposta per 7 anni ad un gradiente di perturbazione costituito dalla rimozione annuale delle fronde di *Cystoseira*. Valutando la risposta dell'*understory* (ovvero delle specie che crescono al di sotto della copertura (*canopy*) di *Cystoseira* e che sono ad essa strettamente associate) gli autori hanno osservato che la riduzione della copertura e della biomassa algale ha promosso la colonizzazione del substrato da parte di specie algali a *turf*, fino ad arrivare al collasso dell'*understory* in caso di totale rimozione della *canopy*. Benedetti-Cecchi *et al.* hanno valutato la presenza e il comportamento dei vari indicatori precoci, i quali, in accordo con la teoria proposta, aumentavano significativamente all'avvicinarsi del sistema alla soglia critica. In seguito gli autori hanno potuto osservare come all'aumentare del disturbo (consistente in un'ulteriore rimozione di *canopy* i cui effetti si aggiungevano al disturbo già presente) le prestazioni degli indicatori cambiassero radicalmente. I risultati hanno evidenziato, infatti, come l'autocorrelazione possa rivelarsi un indicatore migliore in caso di fluttuazioni non marcate mentre, al contrario, la varianza si dimostri più adatta in casi di forti fluttuazioni.

1.4 Sistema di studio: il microfitobenthos epilitico

Il microfitobenthos è presente in una grande varietà di habitat (i quali possono spaziare da paludi salmastre a spiagge, comprendendo anche zone intertidali e subtidali con substrato mobile o

roccioso) ed è diffuso a livello globale (MacIntyre *et al.*, 1996). Particolare rilevanza ecologica ha l'ambiente intertidale di costa rocciosa, per la dinamicità e la variabilità di fattori fondamentali nella regolazione dell'abbondanza di questi organismi (es. luce, disseccamento, disponibilità di nutrienti, stress esercitato da erbivori, ecc).

Il microfitobenthos che colonizza i substrati duri (denominato microfitobenthos epilitico, EMPB) è incorporato in un film autoprodotta formato da secrezioni polimeriche extracellulari simili a gel (EPS; Decho, 2000) ed è rappresentato in maggioranza da batteri, cianobatteri, diatomee e spore di macroalghe (ma anche da licheni nelle zone più elevate della costa).

Il microfitobenthos epilitico può apportare un contributo rilevante alla produzione primaria nell'intertidale roccioso (Thompson *et al.*, 2004) e, in particolare nella zona sovrastante il limite superiore dell'alta marea, esso spesso costituisce la principale fonte di nutrimento per gli erbivori microfagi (ad esempio patelle e altri molluschi gasteropodi come le littorine; Skov *et al.*, 2010); inoltre, fornisce il primo sito d'insediamento e di accrescimento per le reclute di macroalghe e invertebrati sessili (Jenkins *et al.*, 2001). La biomassa del microfitobenthos epilitico va incontro a variazioni stagionali, con un massimo nel periodo invernale e un minimo durante l'estate (Underwood, 1984); il ciclo di questi organismi è regolato dall'effetto combinato della temperatura (che agisce come stress da disseccamento) con la pressione di *grazing* (Thompson *et al.*, 2004).

Il microfitobenthos possiede una serie di caratteristiche che lo rendono un sistema di studio ideale per esaminare i *regime shift* direttamente in campo: il ciclo vitale breve di questi organismi rende la dimensione delle popolazioni meno influenzata dalla persistenza di individui di anni precedenti ed è quindi previsto un accoppiamento significativo tra cambiamento ambientale e dinamiche delle popolazioni (Hays *et al.*, 2005; Beardall & Stojkovic, 2006). Oltre a queste caratteristiche, il microfitobenthos presenta ulteriori vantaggi riguardo alle modalità di campionamento: è un sistema che si ritrova diffuso in maniera ubiquitaria in tutti gli ambienti di costa rocciosa a livello globale e le dimensioni microscopiche degli organismi permettono l'analisi di un ampio *range* di scale spaziali (dai mm fino alle centinaia di metri). Inoltre, lo sviluppo di

nuovi metodi di campionamento (es. *colour-infrared imagery*, CIR) ha permesso di ottenere misure quantitative di clorofilla *in situ* (misura indiretta di biomassa), rendendo possibile la raccolta di una grande quantità di dati ad elevata risoluzione spaziale (Dal Bello *et al.*, 2015).

1.5 Scopo della tesi

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di estendere il test sperimentale della teoria del CSD e di valutare le prestazioni degli indicatori precoci di perdita di resilienza in condizioni naturali, utilizzando il biofilm come sistema di studio. In particolare sarà esaminata l'ipotesi secondo cui la capacità di recupero del biofilm da piccole perturbazioni (in questo caso consistenti in piccole rimozioni di biomassa) dovrebbe diminuire lungo un gradiente crescente di disturbo.

A tale scopo è stato allestito un esperimento di campo che ha previsto la creazione di un gradiente crescente di disturbo mediante incremento della temperatura dell'aria, ottenuto per mezzo di camere termiche a riscaldamento passivo. La temperatura svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'abbondanza e nella distribuzione del microfitobenthos epilitico (Thompson *et al.*, 2005). Abbiamo pertanto ipotizzato che l'esposizione prolungata a livelli elevati di temperatura possa condurre il sistema microfitobentonico al collasso. Lo studio permetterà, inoltre, di valutare se gli indicatori indiretti proposti per predire le transizioni critiche, quali ad esempio l'aumento di autocorrelazione e varianza, si comportano come previsto dalla teoria anche in condizioni naturali.

La biomassa del biofilm è stata stimata mediante l'utilizzo di una fotocamera digitale a infrarossi, la quale è in grado di fornire una misura della quantità di clorofilla per unità di superficie, attraverso l'utilizzo di un indice vegetazionale (RVI, *Ratio Vegetational Index*).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Sito di studio

L'esperimento è stato condotto presso la località di Castiglioncello (coordinate $43^{\circ}24'$ N, $10^{\circ}24'$ E, Fig.4) nel comune di Rosignano Marittimo, in provincia di Livorno. Il sito si trova all'interno di

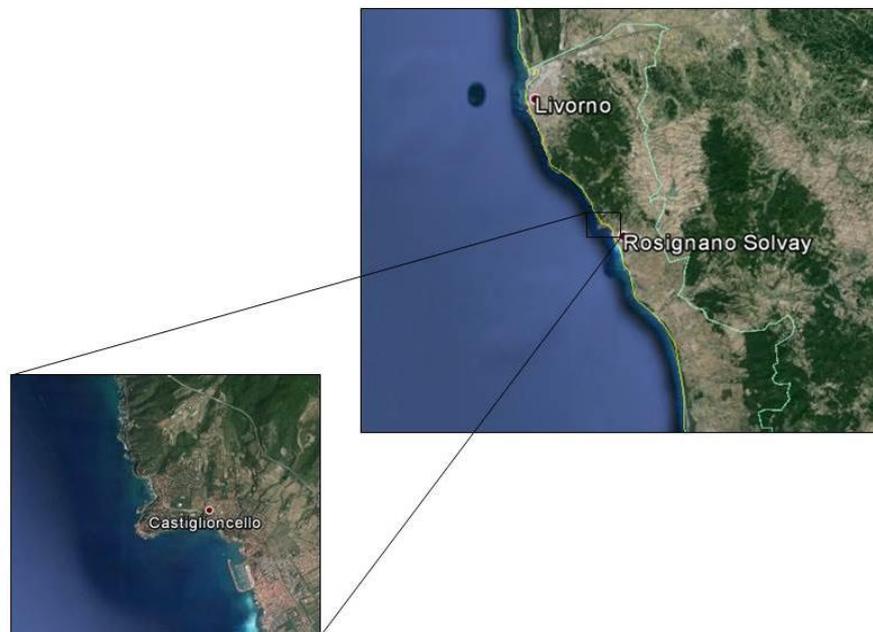


Figura 4. Sito di studio

uno stabilimento balneare privato posto dentro un piccolo porto turistico, il che lo rende maggiormente protetto dal moto ondoso rispetto alla zona circostante.

Lo studio è stato realizzato in una fascia compresa tra 0,2-0,3 m sul Livello Medio di Bassa Marea: a quest'altezza sono presenti perlopiù colonie formate da cianobatteri del genere *Rivularia* e alghe filamentose appartenenti al genere *Polysiphonia*. Raramente si ritrovano erbivori come *Patella aspera* e *Melaraphe neritoides*.

2.2 Disegno di campionamento

Durante l'autunno 2014 sono state installate 21 mattonelle di arenaria nella fascia inferiore del molo dello stabilimento balneare, in modo da permetterne la colonizzazione da parte del EMPB (Fig. 5).



Figura 5. Installazione delle unità sperimentali nel sito di studio

Le mattonelle sono state fissate al substrato mediante perni in acciaio filettati, i quali ne permettevano una facile rimozione quando necessario. Tali mattonelle fungono da substrati artificiali per l'insediamento di organismi bentonici della colonna d'acqua e, in particolare, forniscono un substrato adatto alla colonizzazione dell'EMPB. La fase di colonizzazione ha avuto una durata di circa tre mesi, durante i quali si è provveduto a monitorare periodicamente le mattonelle in modo da poterne valutare lo stato e il grado di colonizzazione.

Durante il febbraio 2015 (periodo della fase di colonizzazione) alle 21 unità sperimentali sono stati attribuiti casualmente i diversi trattamenti. Il disegno sperimentale per valutare gli effetti dell'innalzamento medio della temperatura e testare la teoria del CSD è composto da 2 fattori: il fattore Temperatura con 3 livelli (Naturale, Riscaldamento Moderato e Riscaldamento Elevato)

incrociato al fattore Piccola perturbazione con 2 livelli (Presente e Assente). L'innalzamento medio della temperatura dell'aria è stato realizzato mediante l'utilizzo di camere a riscaldamento passivo (Marion *et al.*, 1997). Le camere erano costituite da una struttura piramidale in Plexiglas® (altamente permeabile sia ai raggi UV che allo spettro di luce visibile) che presentava un'apertura superiore in modo da garantire il passaggio dell'aria. Ogni camera possedeva quattro supporti d'alluminio che ne permettevano l'adesione al substrato (Fig.6).



Figura 6. Allestimento delle camere a riscaldamento passivo

Il gradiente di temperatura è stato ottenuto attraverso la manipolazione dello spessore del Plexiglass e dell'altezza della camera dalla mattonella, ottenendo così due livelli di riscaldamento: il trattamento “Riscaldamento Moderato” (RM in Fig.7) ha previsto la creazione di camere con pareti di Plexiglass di 0,5 cm di spessore e poste ad un'altezza di circa 2 cm dalla mattonella, mentre il trattamento “Riscaldamento Elevato” (RE in Fig.7) ha previsto la creazione di camere con pareti di 1 cm di spessore e poste a 1 cm di altezza dalla mattonella. Il trattamento “Naturale” è stato realizzato allestendo mattonelle prive di camera (Nat in Fig.7).

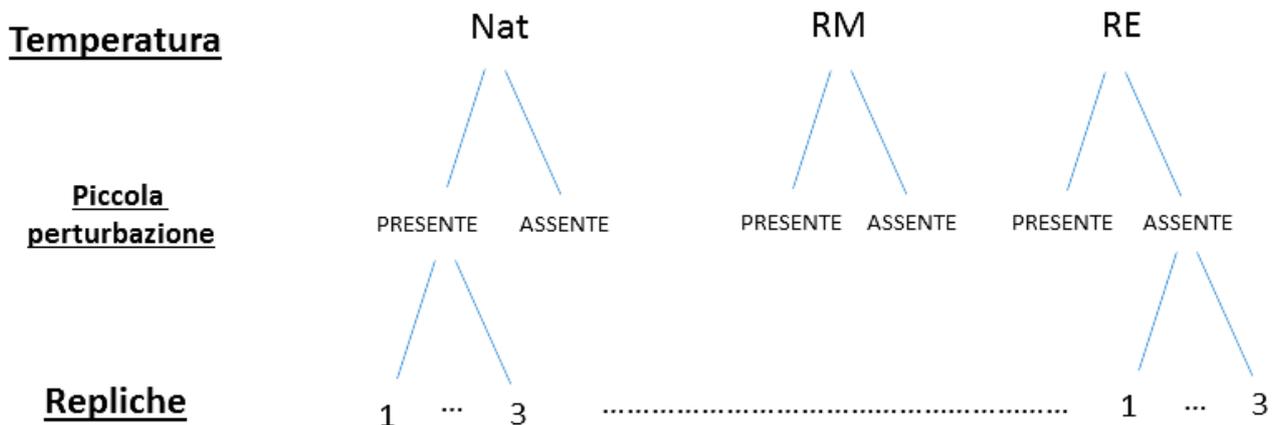


Figura 7. Disegno di campionamento dell'esperimento

Per monitorare la temperatura interna delle camere sono stati apposti termometri a bottone in 9 unità scelte casualmente (3 per ogni livello di Temperatura). La temperatura è stata monitorata durante il corso dell'esperimento ma i termometri sono stati rimossi ogni qualvolta si sono presentate condizioni atmosferiche avverse, in modo da evitare la perdita di dati.

Dato che la struttura stessa delle camere poteva generare degli artefatti, alterando ad esempio l'idrodinamismo o l'ombreggiamento, sono state allestite delle mattonelle ai cui lati sono stati posti i quattro supporti d'ancoraggio (unità di "controllo artefatto", CA).

L'esperimento ha avuto una durata totale di 104 giorni, per un totale di 11 date di campionamento distanziate l'una dall'altra di circa 1-2 settimane. Al giorno 82 è stato applicato il trattamento di piccola perturbazione, il quale è consistito nella rimozione della biomassa del biofilm da un'area di 3x3cm in 3 unità sperimentali per ogni livello del fattore Temperatura.

2.3 Raccolta dati

Le stime di biomassa del biofilm sono state ottenute mediante misure indirette *in situ* della quantità di clorofilla a presente, tramite una tecnica di *remote sensing* (Murphy & Underwood, 2006; Murphy *et al.* 2009) che prevede l'utilizzo di una fotocamera digitale a infrarossi. La fotocamera usata (Agricoltura Digital Camera TETRCAM, ADC) è in grado di registrare la luce riflessa a più lunghezze d'onda, ovvero verde (525-575 nm), rosso (645-689 nm) e *Near-InfraRed* (NIR, 758-833 nm).

Durante la fase di campionamento ogni mattonella è stata fotografata più volte, variando tempi e apertura del diaframma e utilizzando un distanziatore (60 cm di altezza) per mantenere fissa la distanza dal substrato e in modo da tenere la fotocamera in posizione perpendicolare rispetto all'area da fotografare.

All'interno dell'area è stato posizionato uno standard di riflettanza (ovvero una superficie lambertiana in grado di riflettere omogeneamente la luce) per compensare le differenze dovute alle diverse condizioni d'illuminazione e d'impostazioni d'esposizione della fotocamera.

Le immagini ottenute sono state convertite dal formato RAW al TIF ed è stato poi utilizzato il programma Image J per calcolare i valori dell'indice vegetazionale per 6 ROI (*Region of Interest*) da 128x128 pixel (corrispondenti ad un'area di circa 2x2cm) per ogni immagine.

Gli indici vegetazionali (IV) sono stati sviluppati in modo da poter sintetizzare le informazioni presenti in osservazioni a bande multiple in un singolo valore numerico (Wiegand *et al.*, 1991) e si basano su rapporti costruiti usando a numeratore la riflettanza a lunghezze d'onda in cui la clorofilla è capace di riflettere e a denominatore la riflettanza a lunghezze d'onda in cui la clorofilla assorbe efficientemente (Murphy *et al.*, 2005). L'indice utilizzato nel presente studio è il *Ratio Vegetation Index* (RVI; Jordan, 1969), il quale si basa sul rapporto tra riflettanza nella banda del NIR e nella banda del rosso: all'aumentare della quantità di clorofilla, corrisponde un incremento nell'assorbimento nella banda rosso rispetto alla banda del NIR e quindi una diminuzione della riflettanza nella banda del rosso, che si tradurrà in un aumento del valore del RVI.

L'analisi delle immagini è stata costituita da più fasi. La prima fase di analisi è stata rappresentata dalla calibrazione di ciascuna fotografia con lo standard di riflettanza, in modo da poter rendere comparabili i valori dell'indice RVI ottenuti da differenti immagini. I valori dei singoli pixel di ogni banda sono stati normalizzati rispetto al fattore di riflettanza dello standard di calibrazione per la stessa banda, secondo l'equazione

$$\rho(\text{immagine}) = \frac{DN(\text{immagine})\rho(\text{standard})}{DN(\text{standard})}$$

dove $\rho(\text{immagine})$ rappresenta la riflettanza di ogni pixel dell'immagine, $\rho(\text{standard})$ la riflettanza dello standard, $DN(\text{immagine})$ il Digital Number (valore del pixel) di ciascun pixel dell'immagine e $DN(\text{standard})$ è la media dei DN dei pixel dello standard (Murphy *et al.*, 2006).

La seconda fase ha previsto il calcolo dell'indice RVI per le immagini precedentemente calibrate, ottenendo tale valore dalle aree selezionate all'interno di ciascuna immagine.

L'ultima fase ha previsto la stima della concentrazione di clorofilla per unità di superficie per ogni unità sperimentale ed è, quindi, stato necessario calcolare la relazione tra indice RVI e concentrazione di clorofilla *a* per il sito di studio. Per questo motivo sono stati estratti 52 campioni cilindrici di roccia da mattonelle poste nell'Ottobre 2014 nella località di Calafuria (Livorno, 43°28'N, 10°20'E). I cilindri di roccia ottenuti sono stati poi fotografati con la fotocamera ADC per ottenere i valori dell'indice RVI e dell'area superficiale e in seguito portati in laboratorio per la determinazione della clorofilla *a*, la quale è stata estratta in metanolo (Thompson *et al.*, 1999) e stimata mediante spettrofotometria. I valori di clorofilla ottenuti dalla procedura di laboratorio sono stati poi standardizzati rispetto all'area superficiale dei campioni di roccia, esprimendoli come $\mu\text{g chl } a/\text{cm}^2$. Le stime di clorofilla *a* per le diverse unità sperimentali sono state quindi ottenute mediante la relazione lineare tra RVI e $\mu\text{g chl } a/\text{cm}^2$ (Fig.8).

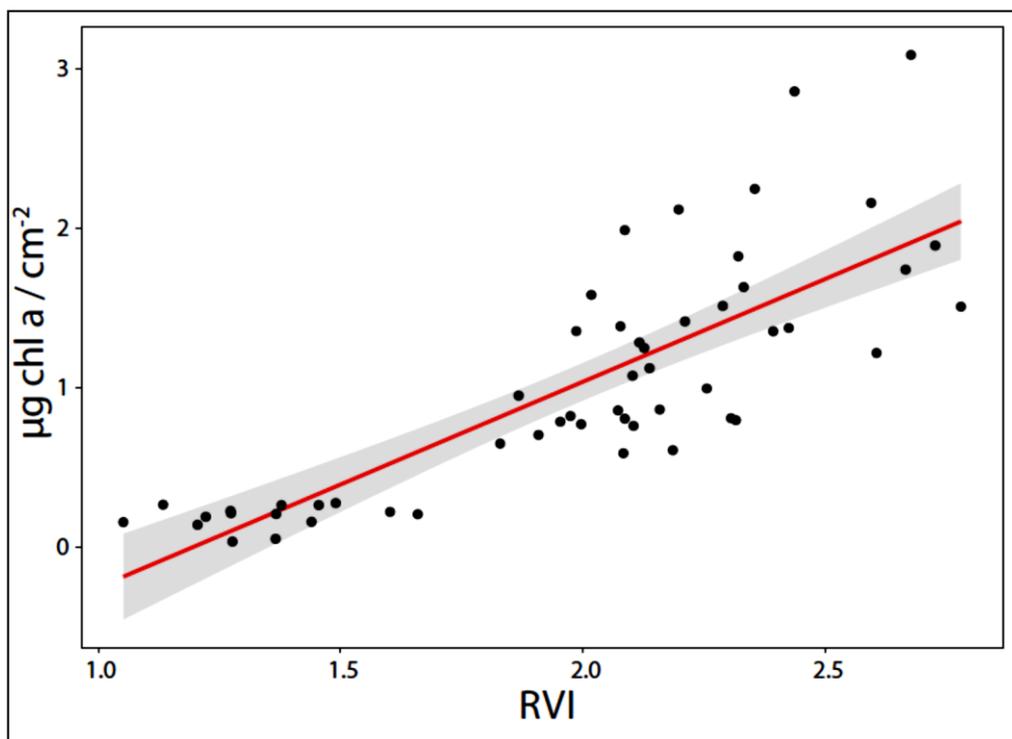


Figura 8. Relazione tra indice RVI e $\mu\text{g chl } a/\text{cm}^2$ ($y=-1.5437+1.2910x$, $R^2 = 0.652$, $SE= 0.264$, $p<0.001$, $n=52$)

2.4 Analisi dei dati

2.4.1 Effetto del riscaldamento

Per valutare gli effetti del gradiente di temperatura sono stati utilizzati *mixed effect model*. Questa tecnica statistica permette di analizzare osservazioni non indipendenti tra di loro, come nel caso di repliche campionate ripetutamente nel tempo (Singer & Willet, 2003). I *mixed effect model* possiedono una parte fissa, contenente i fattori che influenzano la media della variabile di risposta e una parte *random*, che ne influenza invece la varianza (Pinheiro & Bates, 2000).

La parte fissa del modello ha incluso il fattore Temperatura e il Tempo mentre la parte random ha incluso le Repliche (le singole mattonelle). La condizione naturale (Nat) è stata scelta come livello di riferimento per valutare l'effetto del trattamento, in modo da valutare gli effetti fissi come discostamenti dal livello di riferimento.

L'analisi ha incluso le 8 date di campionamento precedenti all'applicazione della piccola perturbazione ed è stata centrata sulla data di applicazione della piccola perturbazione (giorno 82).

Le analisi sono state eseguite con il pacchetto "*lmer*" del software statistico R.

È stato inoltre eseguito un test *t-student* per valutare le differenze tra le variazioni di temperatura dei due trattamenti di riscaldamento RM e RE.

2.4.2 Effetto sulla resilienza del sistema

Per valutare l'effetto la resilienza del sistema nei diversi trattamenti sono stati stimati i tempi di recupero in seguito alla piccola perturbazione. A tale scopo sono stati utilizzati i *mixed effect model* confrontando, in maniera separata per ogni livello del fattore Temperatura, le traiettorie temporali della variabile di stato delle unità sperimentali che hanno subito la piccola perturbazione e di quelle senza piccola perturbazione (le quali sono state utilizzate come livello di riferimento).

Il Tempo è stato incluso sia nella parte fissa del modello che nella parte random per far fronte alla mancanza d'indipendenza statistica nelle osservazioni.

L'analisi è stata centrata sulla data di campionamento alla quale è stata applicata la piccola perturbazione, cosicché gli effetti del trattamento Temperatura riflettessero le deviazioni tra unità perturbate e non perturbate. I termini lineari delle unità perturbate e non perturbate sono stati valutati come interazioni Trattamento x Tempo.

I termini d'interazione lineari sono stati utilizzati per calcolare il tempo di recupero richiesto dalle unità perturbate per tornare ai livelli di riferimento non perturbati. Per fare ciò è bastato risolvere in funzione di t la seguente equazione relativa a ciascun trattamento (il tempo è stato centrato sulla prima data di campionamento per calcolare i tempi di recupero):

$$(\gamma_{00} + \gamma_{01} - b) + (\gamma_{10} + \gamma_{11})t = 0$$

dove t è il tempo, γ_{00} and γ_{01} sono l'intercetta e l'effetto principale del trattamento di perturbazione, γ_{10} and γ_{11} sono i coefficienti di regressione per gli andamenti temporali dei trattamenti non perturbati e perturbati e b è il valore di riferimento al quale il recupero può considerarsi completato. Un valore di riferimento è stato determinato per ogni livello di Temperatura usando i dati provenienti dalle unità non perturbate. Gli intervalli di confidenza per i tempi di recupero sono stati calcolati per 1000 *bootstrap* parametrici di ogni modello fittato.

2.4.3 Indicatori precoci di perdita di resilienza

Per valutare la progressiva perdita di resilienza del sistema sono stati calcolati gli indicatori precoci di perdita di resilienza temporali e spaziali. Gli indicatori temporali sono autocorrelazione (a lag 1), varianza (in termini di deviazione standard) e *skewness* (seguendo il metodo di Dakos *et al* 2012), mentre per gli indicatori spaziali sono stati calcolati correlazione spaziale, varianza spaziale e *skewness* spaziale (Kefi *et al.*, 2014). Gli indicatori temporali sono stati calcolati utilizzando le serie temporali di biomassa per ciascuna replica. Dato che la presenza di un *trend* nella serie potrebbe portare a dei “falsi positivi” (aumento degli indicatori non legato al CSD), prima del calcolo degli indicatori è stato rimosso il *trend* lineare a ciascuna serie temporale (Dakos *et al*, 2008). È stata inoltre eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) per valutare l'effetto del trattamento di riscaldamento sui diversi indicatori temporali.

Gli indicatori spaziali sono stati calcolati alla scala del ROI e poi mediati per ciascuna replica e analizzati tramite *mixed effect model*. L'analisi ha incluso un modello analogo a quello utilizzato per valutare gli effetti del trattamento di riscaldamento sulla biomassa dell'EMPB (paragrafo 2.3.2: Effetti del riscaldamento).

3. RISULTATI

3.1 Effetto del riscaldamento

I dati ottenuti hanno mostrato che le camere a riscaldamento passivo hanno provocato un aumento della temperatura dell'aria rispetto alla condizione naturale di 0,69°C per il trattamento RM e di 1,18°C per il trattamento RE (Fig.9a). Il test *t-student* ha rilevato che l'innalzamento medio di temperatura del trattamento RE è significativamente maggiore rispetto all'innalzamento medio del trattamento RM ($t=-4,01$, $n=10.476$, $p<0,001$) (Fig. 9b).

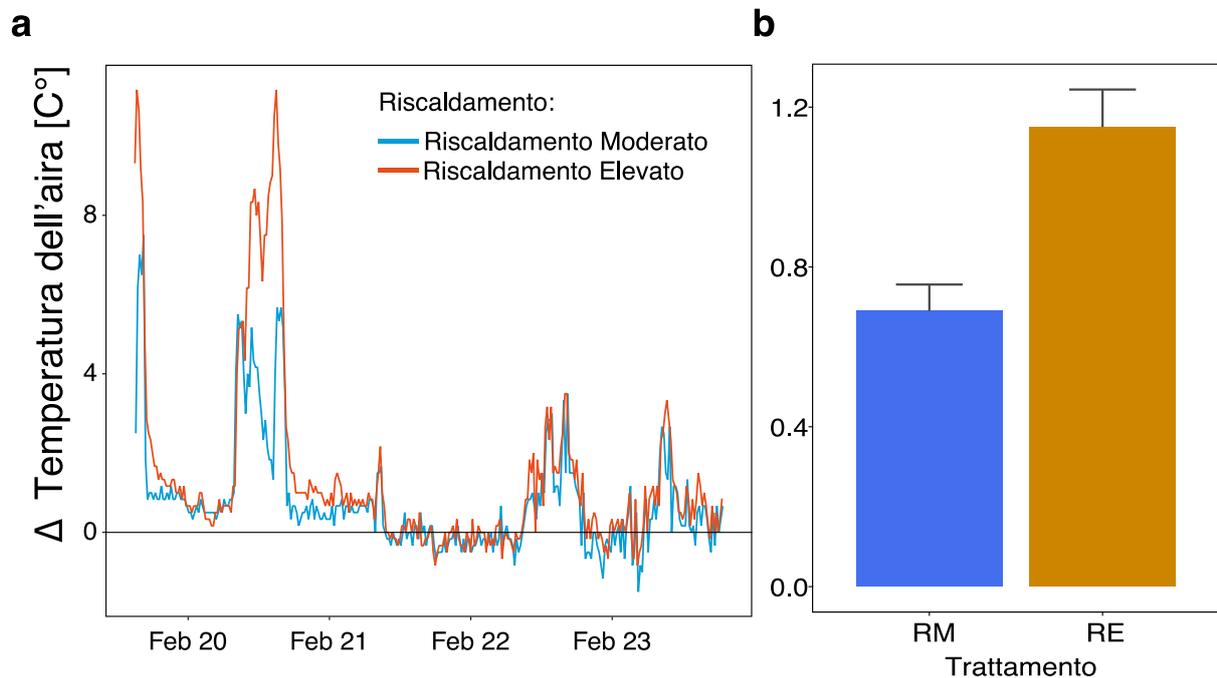


Figura 9. a) Traiettorie temporali della temperatura media dell'aria per i due trattamenti di riscaldamento (RM e RE) rispetto alla temperatura media dei controlli relative l'intervallo di tempo dal 20 al 24 Febbraio; b) Differenza media della temperatura dei due trattamenti di riscaldamento (RM e RE) rispetto al controllo (+1ES).

L'analisi tramite *mixed effect model* mostra un effetto significativo del trattamento di riscaldamento sulla biomassa del EMPB al giorno 82 (Tab.1). L'analisi ha evidenziato, inoltre, un aumento lineare della biomassa nel corso del tempo delle unità sperimentali di controllo, mentre la biomassa dei trattamenti RM e RE mostra un andamento negativo rispetto ai controlli (Nat), rimanendo pressoché costante durante il corso dell'esperimento.

L'analisi, inoltre, non ha riscontrato alcun effetto artefatto dovuto alla presenza delle camere sulla biomassa del EMPB, sia al giorno 82 che nel corso del tempo.

Tabella 1. Risultati dell'analisi con *mixed effect model* sulla biomassa del biofilm per ogni livello del trattamento (Nat, RM, RE, CA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Effetti fissi						
<u>Media al giorno 82 (MG82)</u>				<u>Termine lineare del tempo</u>		
<u>Coefficienti (SE)</u>				<u>Coefficienti (SE)</u>		
Intercetta (Nat)	γ_{00}	2,814(0,2235)	***	γ_{01}	0,01653(0,002788)	***
RM	γ_{01}	-0,8547(0,3160)	*	γ_{11}	-0,01491(0,003943)	***
RE	γ_{02}	-1,208(0,3160)	***	γ_{12}	-0,01844(0,003943)	***
CA	γ_{03}	-0,1582(0,3871)		γ_{13}	0,0007848(0,004829)	

Effetti random						
<u>Varianze</u>			<u>Correlazione</u>			
Residuo	σ_e^2	0,2719	MG82, lineare	σ_{01}	0,449	
Tra le MG82	σ_{01}^2	0,2052				

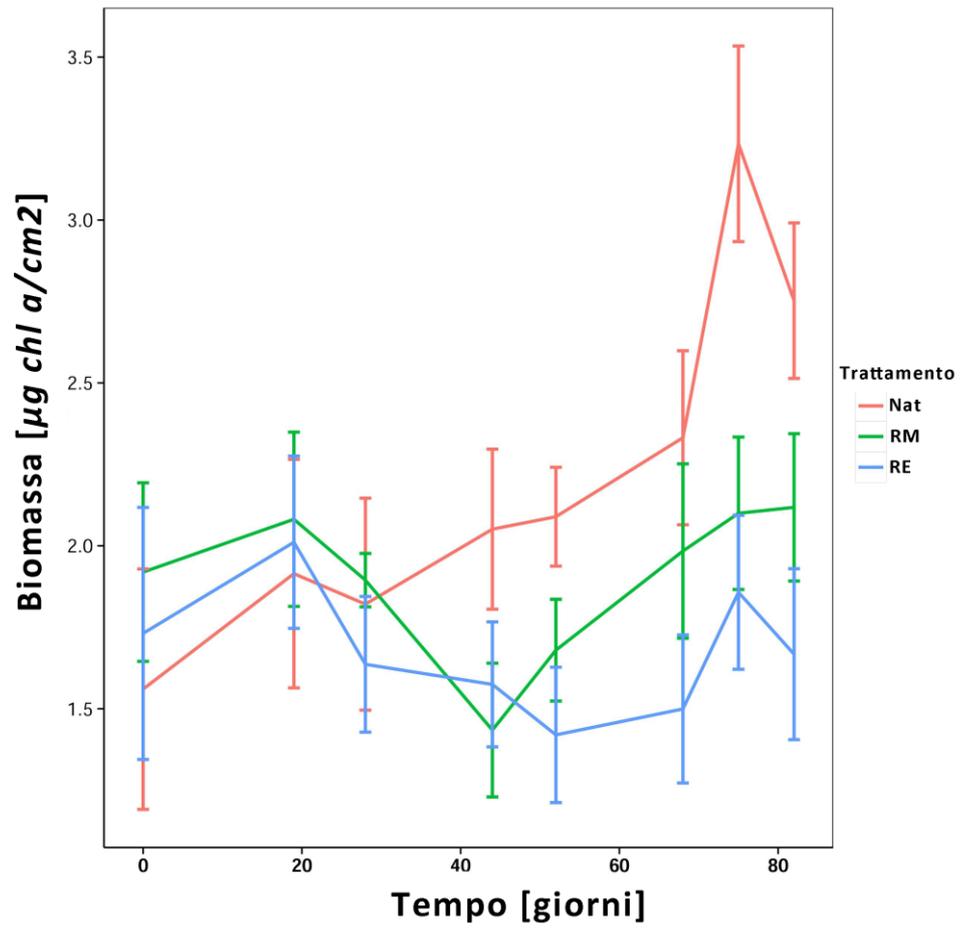


Figura 10. Traiettorie temporali relative alla biomassa (misurata in $\mu\text{g chl a/cm}^2$) per ogni livello del trattamento (Nat, RM, RE) [media \pm ES].

3.2 Effetto sulla resilienza del sistema

Il tempo di recupero del trattamento RE è risultato significativamente maggiore rispetto al tempo di recupero del trattamento RM e alla condizione naturale (Fig.11b).

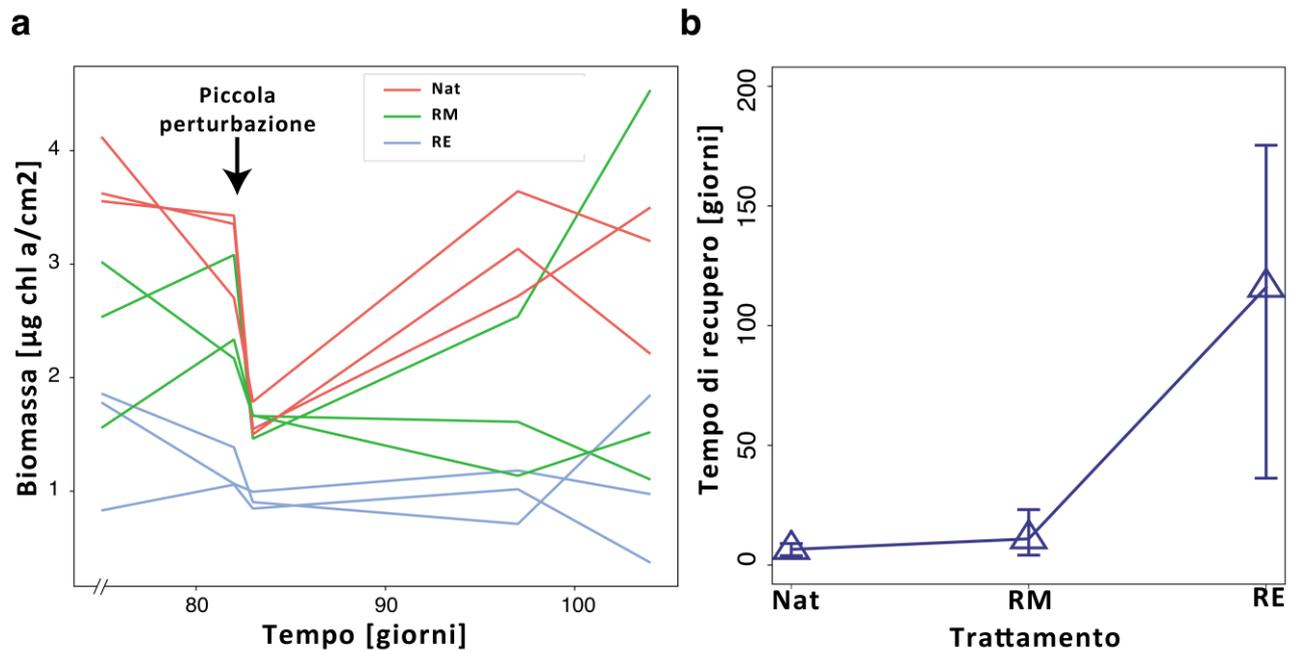


Figura 11. a) Traiettorie nel tempo (da giorno 82 a giorno 104) della biomassa delle unità che hanno subito la piccola perturbazione per ogni livello del trattamento (Nat, RM, RE); b) Tempo di recupero dalla piccola perturbazione per i trattamenti di riscaldamento (Nat, RM, RE).

3.3 Indicatori di perdita di resilienza

3.3.1 Indicatori temporali

Dall'analisi della varianza non sono emerse differenze significative tra i livelli del trattamento di riscaldamento per i tre indicatori temporali (Tab.2 a,b,c). I valori medi dei diversi indicatori temporali sono raffigurati graficamente in Fig.12.

Tabella 2. Risultati dell'ANOVA relativa all'effetto del trattamento di riscaldamento sui tre indicatori temporali. a) Autocorrelazione (a lag1); b) Deviazione standard; c) *Skewness*.

a)

Sorgente di variabilità	G.d.l	Devianze	Varianze	F	p
Trattamento	2	0,0258	0,01291	0,11	0,897
Residui	15	1,763	0,11753		

b)

Sorgente di variabilità	G.d.l	Devianze	Varianze	F	p
Trattamento	2	0,07889	0,03945	3,493	0,0568 .
Residui	15	0,16938	0,01129		

c)

Sorgente di variabilità	G.d.l	Devianze	Varianze	F	p
Trattamento	2	0,1946	0,0973	0,546	0,59
Residui	15	2,672	0,1781		

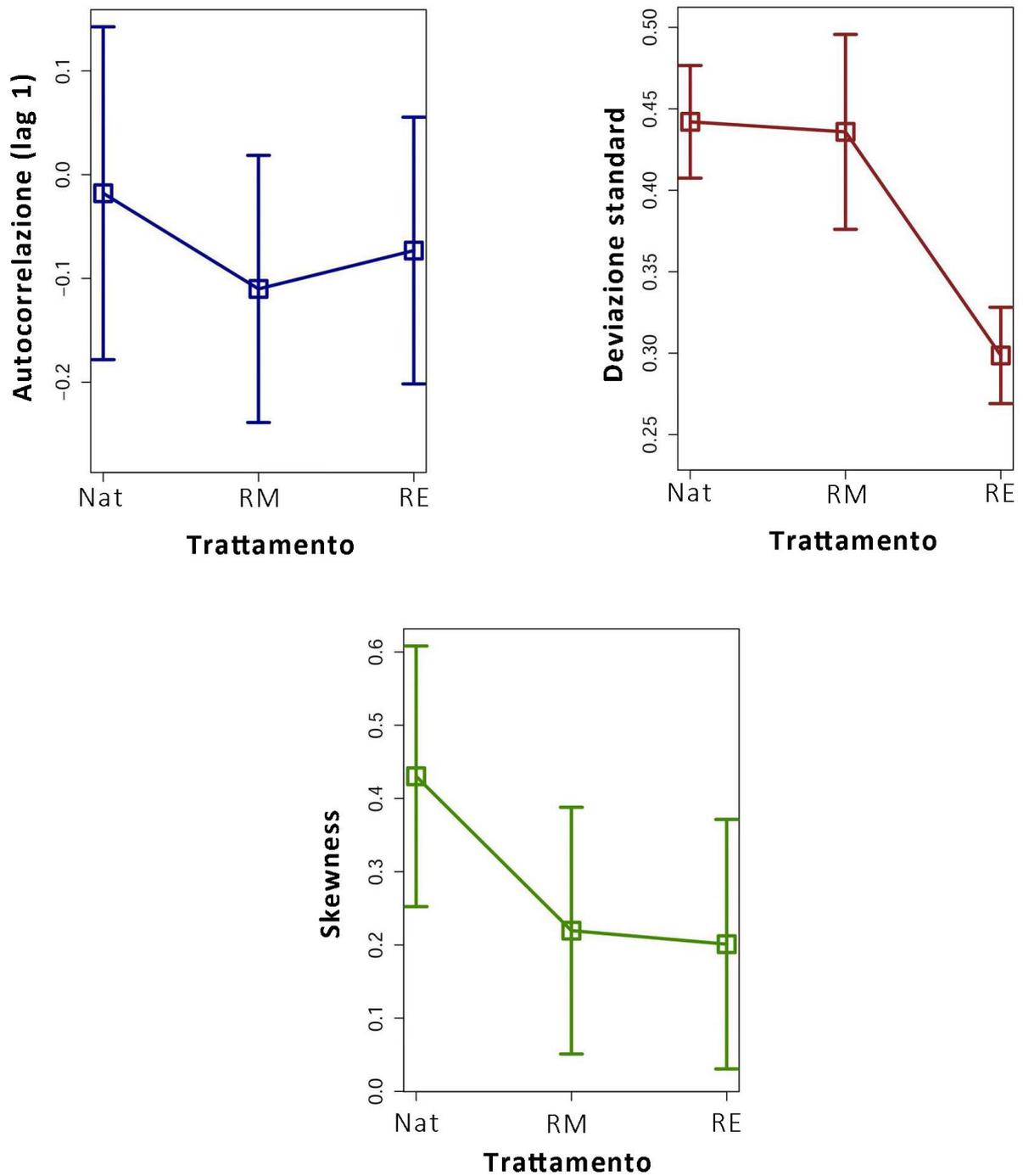


Figura 12. Valori medi degli indicatori temporali per ogni livello di riscaldamento (Nat, RM, RE) (media \pm ES).

3.3.2 Indicatori spaziali

L'analisi tramite *mixed effect model* ha evidenziato un effetto significativo del trattamento di riscaldamento sulla varianza spaziale del EMPB al giorno 82 (Tab. 3b). L'analisi ha evidenziato, inoltre, un aumento lineare positivo della varianza spaziale nel corso del tempo delle unità sperimentali di controllo (Nat), mentre la varianza spaziale dei trattamenti RM e RE mostra un andamento negativo rispetto ai controlli, rimanendo pressoché costante durante il corso dell'esperimento. L'analisi della correlazione spaziale e della *skewness* spaziale non ha evidenziato alcun effetto significativo del trattamento (Tab. 3a, c). Gli andamenti temporali degli indicatori sono illustrati in Fig.13.

Tabella 3. Risultati dell'analisi con *mixed effect model* sugli indicatori spaziali per tutti i livelli di Temperatura (Nat, RM, RE, CA). a) Correlazione spaziale; b) Varianza spaziale; c) *Skewness* spaziale. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Effetti fissi		a)			
		<u>Media al giorno 82 (MG82)</u>		<u>Termine lineare del tempo</u>	
		<u>Coefficienti (SE)</u>		<u>Coefficienti (SE)</u>	
Intercetta (Nat)	γ_{00}	0,7369 (0,008057)	***	γ_{01}	-0,0002427 (0,0001174) *
RM	γ_{01}	-0,0008304 (0,01139)		γ_{11}	0,000004323 (0,0001660)
RE	γ_{02}	-0,002643 (0,01139)		γ_{12}	-0,00008324 (0,0001660)
CA	γ_{03}	0,01154 (0,01396)		γ_{13}	0,000383 (0,0002033)
Effetti random					
		<u>Varianze</u>		<u>Correlazione</u>	
Residuo	σ_e^2	0,0008772	MG82, lineare	σ_{01}	0,366
Tra le MG82	σ_{01}^2	0,0002497			

b)

Effetti fissi

		<u>Media al giorno 82 (MG82)</u>		<u>Termine lineare del tempo</u>	
		<u>Coefficienti (SE)</u>		<u>Coefficienti (SE)</u>	
Intercetta (Nat)	γ_{00}	1,283 (0,07742)	***	γ_{01}	0,006302 (0,001094) ***
RM	γ_{01}	-0,3265 (0,1095)	**	γ_{11}	-0,005271 (0,001547) ***
RE	γ_{02}	-0,4513 (0,1095)	***	γ_{12}	-0,007201 (0,001547) ***
CA	γ_{03}	-0,02715 (0,1341)		γ_{13}	0,0006283 (0,001894)

Effetti random

		<u>Varianze</u>		<u>Correlazione</u>	
Residuo	σ_e^2	0,04185	MG82, lineare	σ_{01}	0,509
Tra le MG82	σ_{01}^2	0,02143			

c)

Effetti fissi

		<u>Media al giorno 82 (MG82)</u>		<u>Termine lineare del tempo</u>	
		<u>Coefficienti (SE)</u>		<u>Coefficienti (SE)</u>	
Intercetta (Nat)	γ_{00}	0,8073 (0,04700)	***	γ_{01}	-0,00132 (0,0008986)
RM	γ_{01}	-0,04371 (0,06647)		γ_{11}	0,001342 (0,001271)
RE	γ_{02}	-0,01681 (0,06647)		γ_{12}	0,0003731 (0,001271)
CA	γ_{03}	0,05497 (0,08141)		γ_{13}	0,0004305 (0,001556)

Effetti random

		<u>Varianze</u>		<u>Correlazione</u>	
Residuo	σ_e^2	0,028248	MG82, lineare	σ_{01}	0,688
Tra le MG82	σ_{01}^2	0,003443			

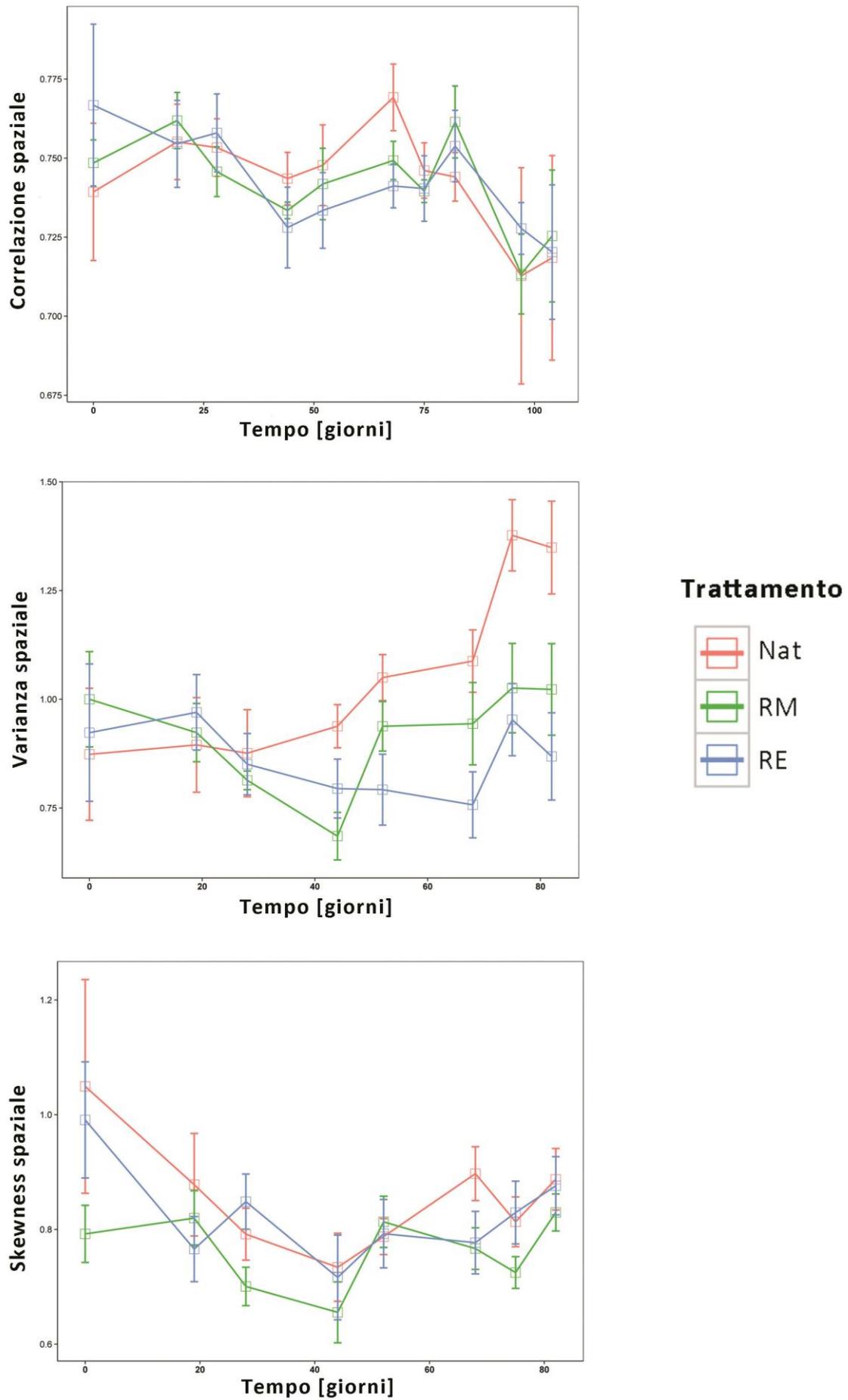


Figura 13. Traiettorie temporali degli indicatori spaziali per i livelli del trattamento di riscaldamento (Nat, RM, RE).

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi rappresenta un tentativo di applicare la teoria del CSD e l'utilizzo degli indicatori precoci di perdita di resilienza ad un esperimento sul campo. Il lavoro ha utilizzato il microfitobenthos epilitico come sistema di studio e ha previsto la creazione di un gradiente crescente di temperatura mediante l'utilizzo di camere a riscaldamento passivo.

Le camere a riscaldamento passivo si sono dimostrate uno strumento efficace per simulare differenti scenari d'incremento medio della temperatura (Marion *et al.*, 1997). Al contrario della maggior parte degli studi in laboratorio, in cui la temperatura assume un valore costante, le camere permettono di aumentare la temperatura media senza annullarne le fluttuazioni giornaliere e/o stagionali.

L'aumento medio della temperatura ha profondamente alterato le dinamiche temporali del EMPB: mentre nei controlli la biomassa è aumentata nel corso del tempo, in entrambi i trattamenti di riscaldamento essa è rimasta pressoché costante. È possibile che l'esposizione prolungata a temperature elevate abbia sottoposto il biofilm a uno stress fisiologico tale da diminuirne in maniera significativa il tasso di crescita. Studi precedenti hanno identificato nei cianobatteri risposte fisiologiche allo stress termico che prevedono una perdita di efficienza dei pigmenti fotosintetici (come la ficobilina, Nakamoto *et al.*, 2000) e della catena di trasporto degli elettroni (Venkataramanaiah *et al.*, 2003). In alternativa, l'aumento di temperatura può aver provocato la scomparsa di specie maggiormente termosensibili che non sono state rimpiazzate da specie termotolleranti. È stato dimostrato, infatti, che le variazioni di temperatura possano effettivamente influenzare la composizione della comunità microfitobentonica, permettendo l'affermarsi di specie differenti all'interno delle comunità a seconda delle diverse condizioni ambientali (come ad esempio popolamenti dominati da cianobatteri in condizioni di temperature elevate; Nagarkar & Williams, 1999). Ciononostante, tale spiegazione non può essere verificata formalmente poiché le

tecniche di campionamento impiegate non permettono di determinare la composizione specifica del biofilm.

Da tali risultati, infine, emerge che un piccolo cambiamento nella temperatura media possa determinare effetti anche severi su comunità che, come il biofilm di costa rocciosa, vivono vicini ai loro limiti di tolleranza (Harley *et al.*, 2006).

Sebbene l'aumento di temperatura applicato non sia stato in grado d'indurre il collasso del biofilm, gli indicatori di perdita di resilienza sono stati misurati al fine di valutare la stabilità del sistema lungo un gradiente di condizioni di stress termico crescente. Recenti studi teorici hanno infatti evidenziato come tali indicatori possano emergere anche in sistemi che non presentano transizioni critiche, estendendone l'utilizzo a un maggior numero di ecosistemi (Kéfi *et al.*, 2013; Boettiger & Hastings, 2012).

L'analisi degli indicatori temporali (autocorrelazioni a *lag 1*, varianza e *skewness*) non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa tra i diversi trattamenti. Solo la varianza spaziale ha mostrato una risposta ai trattamenti applicati, anche se opposta a quanto previsto dalla teoria (Guttal & Jayapraksh, 2009): essa, infatti, diminuisce in funzione del gradiente di temperatura. Tale risultato sembra non essere legato ad un cambiamento della resilienza del sistema, bensì dipendere dalla relazione esistente tra media e varianza: all'aumentare della prima, infatti, aumenta anche la seconda (Figg. 10, 13).

Recenti studi mostrano che l'intensità del *noise* ambientale in un sistema può avere effetti negativi sulle *performance* degli indicatori indiretti, riducendo significativamente la probabilità che essi riescano ad identificare efficacemente l'approssimarsi di un *regime shift* (Peretti & Munch, 2012). L'ambiente intertidale roccioso mediterraneo è caratterizzato da ampie fluttuazioni delle variabili ambientali. Un fattore particolarmente importante nel determinare l'abbondanza e la distribuzione degli organismi di costa rocciosa è lo stress legato all'alternanza di periodi di emersione ed immersione, alla quale sono legate variazioni in termini di temperatura, essiccamento, potenziale osmotico, irradianza (Helmut *et al.*, 2002). Mentre, nei sistemi macrotidali, tale

alternanza è regolata principalmente dalle maree, il Mediterraneo è caratterizzato da un'elevata stocasticità, dovuta all'interazione tra altezza delle onde, pressione barometrica e, in misura minore, maree (Menconi *et al.*, 1999). Tale stocasticità potrebbe essere alla base del mancato “funzionamento” degli indicatori indiretti.

Contrariamente agli indicatori indiretti, il tempo di recupero in seguito alla piccola perturbazione è risultato significativamente maggiore nel trattamento di riscaldamento elevato rispetto al trattamento di riscaldamento moderato e al controllo. Tali risultati confermano come il tempo di recupero in seguito ad una piccola perturbazione sia l'indicatore più robusto nel segnalare l'avvicinamento di un sistema ad un *tipping point* (Dakos *et al.*, 2011).

Il presente lavoro di tesi ha previsto il solo campionamento quantitativo del biofilm ma potrebbe risultare utile in studi futuri associare al campionamento quantitativo anche indagini dal punto di vista della composizione specifica dei popolamenti, tramite prelievo ed esame visivo di campioni di biofilm in laboratorio. Il riconoscimento visivo in laboratorio potrebbe, inoltre, essere accostato alla ricerca di indicatori sia fisiologici che genetici, nell'ottica di ottenere risultati più validi per quanto riguarda il riconoscimento specifico e lo studio degli eventuali meccanismi di risposta fisiologica allo stress termico.

BIBLIOGRAFIA

- Beardall J. & Stojkovic S., 2006. Microalgae under global environmental change: implications for growth and productivity, populations and trophic flow. *Science Asia*, 32(1):1–10 (2006).
- Benedetti-Cecchi L., Tamburello L., Maggi E., Bulleri F., 2015. Experimental perturbations modify the performance of early warning indicators of regime shift. *Current Biology* (2015).
- Biggs R., Carpenter S.R., Brock W.A., 2009. Turning back from the brink: detecting an impending regime shift in time to avert it. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 826-831 (2009).
- Boettiger C. & Hastings A., 2012. Early warning signals and the prosecutor's fallacy. *Proc.R.Soc.B* 279(1748): 4734-4739.
- Carpenter S. R., Ludwig D. & Brock W. A., 1999. Management of eutrophication for lakes subject to potentially irreversible change. *Ecol. Appl.* 9, 751±771 (1999).
- Carpenter S.R., Cole J.J., Pace M.L., Batt R., Brock W.A., Cline T., Coloso J., Hodgson J.R., Kitchell J.F., Seekell D.A., Smith L., Weidel B., 2011. Early warning of regime shifts: a whole-ecosystem experiment. *Science* 332, 1079 (2011).
- Dai L., Vorselen D., Korolev K.S., Gore J., 2012. Generic indicators of loss of resilience before a tipping point leading to population collapse. *Science* 336, 1175 (2012).
- Dakos V., Scheffer M., van Nes E.H., Bovkin V., Petoukhov V., Held H., 2008. Slowing down as an early warning signal for abrupt climate change. *PNAS*, vol.105, n.38 (September 2008), pp. 14308-14312.
- Dakos V., Kéfi S., Rietkerk M., van Nes E.H., Scheffer M., 2011. Slowing down in spatially patterned ecosystems at the brink of collapse. *Am. Nat.* vol.177, n.6 (June 2011), pp. E153-E166.

- Dakos V., Carpenter S.R., Brock W.A., Ellison A.M., Guttal V., Ives A.R., Kéfi S., Livina V., Seekell D.A., van Nes E.H., Scheffer M., 2012. Methods for detecting early warning signals of critical transition in time series illustrated using simulated ecological data. *Plos ONE* 7(7).
- Dal Bello M., Maggi E., Rindi L., Capocchi A., Fontanini D., San-Lazaro C., Benedetti-Cecchi L., 2014. Multifractal spatial distribution of epilithic microphytobenthos on a Mediterranean rocky shore. *Oikos* 124:477-485 (2015).
- Decho A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* 20:1257–1273.
- Done, T. J. Phase shifts in coral reef communities and their ecological significance. *Hydrobiologia* 247, 121-132 (1991).
- Drake J.M. & Blaine D.G., 2010. Early warning signals of extinction in deteriorating environments. *Nature* 467, 456 (2010).
- Dublin H. T., Sinclair A. R. & McGlade J., 1990. Elephants and fire as causes of multiple stable states in the Serengeti-Mara woodlands. *J. Anim. Ecol.* 59, 1147±1164 (1990).
- Guttal V., Jayaprakash C., 2009. Spatial variance and spatial skewness: leading indicators of regime shifts in spatial ecological systems. *Theor Ecol* (2009) 2:3–12.
- Harley C.D.G., Hughes A.R, Hultgren K.M., Miner B.G., Sorte C.J.B., Thornber C.S., Rodriguez L.F., Tomanek L., Williams S.L., 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* 9(2), 228-241.
- Hays G.C., Richardson A.J., Robinson C., 2005. Climate change and marine plankton. *Trends Ecol. Evol*, 20:337–44 (2005).
- Helmut B., Harley C.D., Halpin P.M., O'Donnell M., Hofmann G.E., Blanchette C.A., 2002. Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. *Science*, 298, 1015-1017.
- Jackson A. C. Underwood A. J. , Murphy R. J. , Skilleter G. A., 2010. Latitudinal and environmental patterns in abundance and composition of epilithic microphytobenthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 417: 27–38.

- Jenkins S.R., Arenas F., Arrontes J., Bussell J., 2001. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. *Mar Ecol Prog Ser* 211:193–203.
- Jordan C.F., 1969. Derivation of leaf-area index from quality of light on the forest floor. *Ecology* vol.50, n.4 (July, 1969), pp.663-666.
- Kéfi S., Dakos V., Scheffer M., van Nes E.H., Rietker M., 2013. Early warning signals also precede non-catastrophic transitions. *Oikos* 122(5): 641-648.
- Kéfi S., Guttal V., Brock W.A., Carpenter S.R., Ellison A.M., Livina V.N., Seekell D.A., Scheffer M., van Nes E.H., Dakos V., 2014. Early Warning Signals of Ecological Transitions: Methods for Spatial Patterns. *PLoS ONE* 9(3): e92097.
- Knowlton N., 1992. Thresholds and multiple stable states in coral reef community dynamics. *Am. Zool.* 32, 674-682 (1992).
- MacIntyre H.L., Geider R.J., Miller D.C., 1996. Microphytobenthos: the ecological role of the ‘secret garden’ of unvegetated, shallow-water marine habitats. 1. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19:186–201
- Marion G.M., Henry G.H.R., Freckman D.W., Johnstone J., Jones G., Jones M.H., Levesque E., Molau U., Molgaard P., Parsons A.N., Svoboda J., Virginia R.A., 1997. Open-top designs for manipulating field temperature in high-latitude ecosystems. *Global Change Biology* 3(1), 20-32 (1997).
- May R.M., 1977. Thresholds and breakpoints in ecosystems with a multiplicity of stable states. *Nature* 269, 471-477 (1977).
- McCook L.J., 1999. Macroalgae, nutrients and phase shifts on coral reefs: scientific issues and management consequences for the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 18, 357-367 (1999).
- Menconi, M., Benedetti-Cecchi L., Cinelli F., 1999. Spatial and temporal variability in the distribution of algae and invertebrates on rocky shores in the northwest Mediterranean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233: 1–23.

- Murphy R.J., Tolhurst T.J., Chapman D.J., Underwood A.J., 2005. Estimation of surface chlorophyll-a on an exposed mudflat using field spectrometry: accuracy of ratios and derivative-based approaches. *International Journal of Remote Sensing* 26: 1835–1859.
- Murphy R.J., Underwood A.J., Pinkerton M.H., 2006. Quantitative imaging to measure photosynthetic biomass on an intertidal rock-platform. *Marine Ecology Progress Series* 312: 45–55.
- Nagarkar S., Willams G.A., 1999. Spatial and temporal variation of cyanobacteria-dominated epilithic communities on a tropical shore in Hong Kong. *Phycologia*, 38(5):385-393.
- Nakamoto H., Suzuki N., Roy S.K, 2000. Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Letters*, 483 (2000) 169-174
- Peretti C.T. & Munch S., 2012. Regime shift indicators fail under noise level commonly observed in ecological system. *Ecological Applications*, 22(6), pp. 1772-1779 (2012).
- Rocha J., Yletyinen J., Biggs R., Blenckner T., Peterson G., 2015. Marine regime shifts: drivers and impacts on ecosystems services. *Phil. Trans. R. Soc. B* 37: 20130273
- Scheffer M., Carpenter S., Foley J.A., Folke C., Walker B., 2001. Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature* 413, 591-596.
- Scheffer M. & Carpenter S., 2003. Catastrophic regime shifts in ecosystem: linking theory to observation. *Trends Ecol. Evol.* 18, 648-656 (2003).
- Scheffer M., 2009. Critical transitions in nature and society. Princeton University Press.
- Scheffer M., Bascompte J., Brock W.A., Brokvin v., Carpenter S.R., Dakos V., Held H., van Nes E.H., Rietkerk M., Sugihara G., 2009. Early-warning signals for critical transitions. *Nature* 461, 53–59 (2009).
- Scheffer M., Carpenter S.R., Lenton T.M., Bascompte J., Brock W., Dakos V., van de Koppel, J., van de Leemput I.A., Levin S.A., van Nes E.H., Pascual M., Vandermeer J., 2012. Anticipating critical transition. *Science* 338, 344 (2012).

- Singer J.D., Willett J.B., 2003. Applied longitudinal data analysis modeling change and event occurrence. *Oxford University Press*. New York, USA.
- Skov M. W., Volkelt-Igoe M., Hawkins S. J., Jesus B., Thompson R. C., Doncaster C. P., 2010. Past and present grazing boosts the photo-autotrophic biomass of biofilms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 401: 101–111 (2010).
- Thompson R. C., Tobin M. L., Hawkins S. J., Norton T. A., 1999. Problems in extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll from epilithic microbial biofilms: towards a standard method. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 79: 551-558.
- Thompson R.C., Norton T.A., Hawkins S.J., 2004. Physical stress and biological control regulate the producer-consumer balance in intertidal biofilms. *Ecology* 85:1372–1382
- Thompson R.C., Moschella P.S., Jenkins S.R., Norton T.A., Hawkins S.J., 2005. Differences in photosynthetic marine biofilms between sheltered and moderately exposed rocky shores. *Mar Ecol Prog Ser.* 296: 53–63.
- Underwood A.J., 1984. The vertical-distribution and seasonal abundance of intertidal microalgae on a rocky shore in New-South-Wales. *J Exp Mar Biol Ecol* 78:199–220
- van Nes E. H. & Scheffer M., 2007. Slow recovery from perturbations as a generic indicator of a nearby catastrophic shift. *Am. Nat.* 169, 738–747 (2007).
- Veraart A.J., Faassen E.J., Dokos V., van Nes E.H., Lurling M., Scheffer M., 2012. Recovery rates reflect distance to a tipping in a living system.
- Venkataramanaiah V., Sudhir P., Murthy S.D.S., 2003. Effect of High Temperature on Photosynthetic Electron Transport Activities of the Cyanobacterium *Spirulina Platensis*. *Photosynthetica*, vol. 41, 3, pp 331-334.
- Wang G. L. & Eltahir E. B., 2000. Ecosystem dynamics and the Sahel drought. *Geophys. Res. Lett.* 27, 795-798 (2000)
- Wiegand C. L., Richardson, A. J., Escobar, D. E., Gerbermann, A.H., 1991. Vegetation indices in crop assessments. *Remote Sensing of Environment* 35: 105-19.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto la mia famiglia, in particolare i miei genitori e mia sorella Sara (se fosse possibile essere qualcosa di più di una sorella tu lo saresti) per tutto il supporto ricevuto in questi anni, non sarei mai stata chi sono adesso senza il vostro costante appoggio. Mi avete sempre spinto a dare il massimo in ogni aspetto della vita e, anche se spesso non l'ho capito subito, avete sempre desiderato il meglio per me.

Ringrazio il prof. Lisandro Benedetti-Cecchi per avermi dato l'opportunità di lavorare con il suo gruppo e fare esperienza su argomenti così interessanti e innovativi, sicuramente questo periodo ha contribuito e continuerà a contribuire alla mia crescita professionale e umana.

Ringrazio tutti i ragazzi del laboratorio per aver condiviso con me gioie e dolori di questi due anni (soprattutto le giornate gelide a Calafuria). Un grazie particolare a Luca per avermi sopportato tanto (anche troppo), per i consigli e il sostegno, per le prese in giro e per aver diviso con me la sua conoscenza ed esperienza.

Grazia anche alla dott.ssa Capocchi e alla dott.ssa Fontanini per le analisi svolte, un contributo fondamentale a questo lavoro di tesi.

Ringrazio anche gli amici, vecchi e nuovi, che mi sono stati accanto lungo questo percorso, ringrazio particolarmente chi è sempre rimasto senza mandarmi a quel paese tutte le volte che me lo sarei meritato. Grazie Sole, sorella acquisita, anche se lontana hai sempre trovato il modo di tirarmi su il morale e spingermi ad andare avanti.

Ringrazio infine Claudio: grazie per avermi compreso realmente, grazie per aver capito (da solo!) quando avevo bisogno di averti accanto e quando invece è stato meglio lasciarmi i miei spazi, grazie per avermi "smascherato" tutte le volte in cui dicevo di non essere stanca e di non aver bisogno (e per avermi obbligata a fermarmi per prendere fiato), grazie per i continui stimoli e per le sonore tirate d'orecchie, grazie per aver sempre creduto in me.