



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA VITERBO

DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO SOSTENIBILE CORSO DI
DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE
BIOLOGICHE - XXIV CICLO

TITOLO TESI DEL DOTTORATO DI RICERCA

***Studio di una Comunità di Peracaridi (Crostei) dell'Alto
Adriatico e loro utilizzo come indicatori di perturbazione
ambientale***

(BIO/07)

Coordinatore:

Prof.ssa Roberta Cimmaruta

Tutor

Dott. ssa Benedetta Trabucco

Candidata

Veronica Marusso

VITERBO, FEBBRAIO 2013

INDICE

1.INTRODUZIONE	4
2.SCOPO DEL LAVORO	6
3.MATERIALI E METODI	10
3.1 Inquadramento dell'area di studio.....	10
3.2 Piano di campionamento	12
3. 3 Analisi ecologiche.....	18
3. 4 Analisi genetiche.....	20
4.RISULTATI	22
4.1 Risultati analisi ecologiche.....	22
4.1.1 Parametri ambientali.....	22
4.1.2 Popolamento dei Peracaridi.....	25
4.2 Risultati analisi genetiche.....	46
5.DISCUSSIONI	53
5.1 Discussioni dati ecologici.....	53
5.2 Discussioni dati genetici.....	63
6.CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69
ALLEGATI.....	77

RINGRAZIAMENTI

Il mio primo ringraziamento va all'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo per avermi dato l'opportunità di svolgere la mia ricerca nell'ambito del corso di Dottorato di Ricerca in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche.

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Roberta Cimmaruta che mi ha permesso di sviluppare questo progetto di ricerca accompagnandomi, guidandomi e supportandomi con grande pazienza in tutti questi anni, mi auguro che lo scambio scientifico continui negli anni futuri.

Un caro ringraziamento va alla Dott.ssa Benedetta Trabucco, mia guida da quasi un decennio, da cui ho ricevuto un grande appoggio e che senza di lei nulla di tutto ciò si sarebbe pensato, sperimentato, realizzato.

Un ringraziamento va ai miei colleghi/e del Laboratorio di Ecologia Benthos dell'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale): Tiziano, Serena, Danilo e Fabio che mi hanno aiutata alla raccolta del materiale in mare.

Un grazie va alla Dott.ssa Claudia Virno Lamberti responsabile del progetto *Adriatic LNG Terminal* attraverso il quale è stato possibile ottenere dati e campioni.

Inoltre vorrei ringraziare il Dott. Dario Angeletti e la Dott.ssa Silvia Cecchetti dell'Università della Tuscia per il loro grandissimo e prezioso supporto nelle indagini genetiche effettuate.

Grazie anche alla Dott.ssa Ornella Nonnis e Dott.ssa Chiara Maggi per la possibilità data di prelevare campioni per effettuare il confronti su scala geografica.

Ringrazio il mio “coinquilino” che non si è mai lasciato travolgere dalla mia agitazione ma al contrario mi ha trasmesso calma e serenità.

Ringrazio infine la mia famiglia per aver sostenuto sempre le mie scelte e per aver avuto fiducia in me.

1.INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, la Comunità scientifica nazionale ed internazionale ha indirizzato i propri studi in maggior misura sulla componente biologica dell'ecosistema, al fine di valutare lo stato di qualità dell'ambiente. Tale componente, infatti, può rispondere ad alterazioni ambientali con differenti gradi di sensibilità, fornendo un prezioso strumento di valutazione dell'integrità ecosistemica, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

Normative comunitarie come la *Water Framework Directive* (2000/60/EC) e la *Marine Strategy Framework Directive* (2008/56/EC) pongono, infatti, particolare attenzione alle componenti biotiche dell'ecosistema, rispondendo all'esigenza di un contesto normativo finalizzato all'innalzamento della qualità dell'ecosistema acquatico attraverso una chiave di lettura ecologica.

Lo studio della componente biologica riveste, quindi, un ruolo centrale sia per la definizione dello *stato ambientale* nel suo complesso sia per la raccolta delle informazioni di base utili alla conservazione e alla gestione degli ecosistemi marino costieri, nell'ottica di uno sviluppo sostenibile.

All'interno della matrice biotica è sovente il “benthos” ad essere usato per tali finalità. Con il termine “benthos” si intende l'insieme degli organismi che vivono a stretto contatto con il fondo marino, costituito sia da organismi animali (zoobenthos) che vegetali (fitobenthos), in particolare le comunità macrozoobentoniche dei fondi mobili, costituite da organismi con dimensioni superiori a 1 mm (Cognetti e Sarà 1972), vengono considerate un valido descrittore sintetico dell'ambiente.

Le caratteristiche che le rendono tali sono:

- presenza di organismi sedentari o poco vagili che hanno dunque una stretta relazione con il fondo;
- diversa sensibilità a vari tipi di inquinanti che si accumulano proprio a livello dei sedimenti;
- cicli vitali relativamente lunghi, che permettono una risposta integrata nel tempo alle variazioni ambientali;
- presenza di specie con diversi ruoli trofici e con differente tolleranza allo stress.

Le motivazioni per le quali gli invertebrati del macrozoobenthos di fondi mobili rivestono un ruolo primario nello studio dei sistemi marino costieri sono, dunque, molteplici. Tali organismi

rappresentano una delle vie principali nel ciclo dei nutrienti e partecipano allo scambio di sostanze tra i sedimenti, la colonna d'acqua ed i diversi livelli trofici, attraverso vari meccanismi quali l'ingestione dei pellets, il trasporto verticale del detrito organico dallo strato ridotto all'interfaccia acqua-sedimento e la risospensione del sedimento (Bilyard, 1987). Anche la bioturbazione, che essi operano, contribuisce allo scambio di sostanze tra sedimenti, colonna d'acqua e i diversi livelli trofici, rimettendo in circolo le sostanze mineralizzate nel sedimento (Montagna, 2005). Inoltre, l'estrema eterogeneità trofico-funzionale delle specie che compongono tali comunità fa dello studio della struttura dei popolamenti un prezioso strumento di valutazione dello *stato ambientale*.

La strutturazione di una comunità macrozoobentonica dipende sia fattori biotici che abiotici, come ad esempio le relazioni inter- ed intra-specifiche, l'idrodinamismo, le caratteristiche del sedimento (tra le altre la granulometria), la presenza di sostanze inquinanti (Castelli et al., 2003): se una di queste caratteristiche subisce una variazione si può assistere ad una conseguente modificazione/alterazione dell'aspetto della comunità (Pearson e Rosenberg, 1978; Gray, 1981; Gray et al., 1990; Warwick e Clarke, 1991).

Dunque, lo studio del macrozoobenthos di fondo mobile rappresenta un importante strumento per il monitoraggio dell'ambiente marino, soprattutto per quel che riguarda gli ambienti costieri dove insistono la maggior parte delle attività antropiche e dove le fluttuazioni delle variabili ambientali sono più evidenti (Castelli et al., 2003).

2.SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro di Tesi si inserisce nell'ambito del Progetto di Ricerca *Adriatic LNG Terminal* (ALNG), che riguarda la costruzione e l'esercizio di un Terminale *offshore* per la rigassificazione di Gas Naturale Liquefatto (GNL) e della relativa Condotta di connessione alla rete nazionale di distribuzione (Edison, 1998; ICRAM, 2005a) che ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) porta avanti dal 2005.

Complessivamente l'opera consiste nella messa in esercizio delle seguenti infrastrutture:

- ✓ un *Terminale* marino, che consente l'accosto e l'ormeggio di navi metaniere, lo scarico, lo stoccaggio e la rigassificazione del Gas Naturale Liquefatto (GNL), ubicato a circa 15 km di distanza dalla costa al largo di Porto Levante;
- ✓ una *Condotta* per l'invio del gas a terra, costituita da un tratto a mare (*off-shore*), lungo circa 15,3 km (dal Terminale alla costa), e un tratto a terra (*on-shore*);
- ✓ una *Cabina di riduzione e misura gas* a monte del collegamento con la rete nazionale.

La condotta, che si sviluppa lungo il tracciato sottomarino interrato (*off-shore*), collega il Terminale con la costa, in località Porto Levante, procedendo dalla piattaforma al punto di approdo in direzione Sud-Ovest, e attraversando un tratto di mare caratterizzato da batimetrie che variano da 28 metri a pochi metri (3-5 m) in prossimità della costa.

Da un punto di vista operativo, la tecnica costruttiva nel tratto a mare ha previsto la posa della condotta sul fondo, seguita da un post-scavo per l'interramento in trincea, le cui dimensioni sono di circa 3-4 metri di larghezza, e dal successivo ricoprimento.

Il piano di monitoraggio di tipo integrato, prevede, oltre a diverse indagini chimiche e fisiche, anche indagini nel comparto biotico, tra le quali lo studio delle comunità bentoniche di fondo mobile.

Le comunità bentoniche sono costituite da un elevato numero di specie, ed una loro accurata identificazione implica un notevole dispendio di risorse, sia in termini intellettivi, per il raggiungimento del livello di conoscenze tassonomiche necessario, sia in termini puramente economici. Pertanto, accade sovente che, nell'ambito di studi che riguardano tali popolamenti, al fine di raggiungere un'ottimizzazione nell'utilizzo delle risorse summenzionate, ci si limiti

all'analisi dei gruppi qualitativamente e quantitativamente dominanti, come Policheti, Molluschi, Crostacei ed Echinodermi (Morri et al., 2003).

Tra questi, potrebbe essere addirittura impiegato anche un solo syntaxon, in grado di descrivere in maniera esaustiva la struttura dell'intero popolamento: Molluschi e Policheti, ad esempio, sono taxa particolarmente idonei a svolgere questo ruolo di *descrittore efficace* delle comunità (Gambi et al., 1982; Morri et al., 2003), anche nel caso di studi che riguardano la dinamica o l'evoluzione della struttura del popolamento, in funzione di fattori ambientali naturali e/o antropici.

Esistono infatti numerosi studi sui nostri mari, riguardanti la comunità bentonica con i suoi gruppi principali o riguardanti singoli taxa, usati come strumento per indagare gli effetti prodotti da perturbazioni di origine antropica (Nicoletti et al., 2004; Martin et al., 2005; Bertasi et al., 2005; Simonini et al., 2005; 2007; Colosio et al., 2007; Marusso et al. 2007; Trabucco et al. 2008; La Porta et al. 2009; Tomassetti et al. 2009; La Valle et al., 2011). La maggior parte dei lavori su singoli taxa sono relativi a Molluschi e Policheti.

Sicuramente meno numerosi sono invece i lavori che riguardano gli altri grandi gruppi, caratterizzanti i popolamenti bentonici di fondi mobili, quali Echinodermi e Crostacei. In particolare, per quest'ultimo le ricerche trattano principalmente l'Ordine dei Decapodi (e.g. García Raso et al., 2002)

Un gruppo di Crostacei, invece, che a nostro avviso meriterebbe maggiore attenzione è il taxon dei Peracaridi, Superordine di Crostacei Malacostraci, poiché essi rappresentano circa il 40% di tutti i Crostacei; negli ambienti marini della piattaforma e della scarpata continentale essi superano spesso in numero e diversità in specie tutti gli altra taxa di Crostacei; rappresentano, inoltre, una componente primaria del macrobenthos di profondità. Infine, mancando di uno stadio larvale pelagico e avendo esigenze specifiche riguardo i parametri abiotici, i Peracaridi mostrano bassi tassi di dispersione, rendendosi così eccellenti candidati per studi di tipo ecologico e biogeografico (Thomas, 1993).

Questo taxon è costituito da diversi Ordini, tra i quali Anfipodi, Isopodi, Cumacei e Tanaidacei. Esistono studi che individuano i singoli Ordini, o specie ad essi appartenenti, come potenziali descrittori: i Cumacei sono buoni indicatori degli effetti dell'eutrofizzazione (Corbera et al. 1995); tra i Tanaidacei, alcune specie descrivono l'arricchimento organico (De-la-ossa-Carretero, 2010); infine, tra gli Anfipodi sono presenti specie indicatrici di idrocarburi (Conradi et al 1997; Gomez-Gesteira et al. 2000; De-la-ossa-Carretero et al, 2012).

Tuttavia, esistono pochi studi in cui è indagata l'intera comunità dei Peracaridi, e tali lavori si limitano a descriverne la struttura da un punto di vista quali-quantitativo (e.g. Thiel et al. 2003; Lourido et al. 2008; Moreira et al. 2008; Stransky et al. 2010), ma raramente a studiarne le risposte ecologiche in relazione ad eventi di perturbazione (e.g. Lewis et al., 2002; Marusso et al., 2013 in press)

Scopo primario di questo lavoro è stato, quindi, quello di ampliare le conoscenze ecologiche su questo Superordine di Crostacei, verificando in particolare se si dimostrano buoni indicatori delle variazioni ambientali, al pari dell'intera comunità bentonica.

L'idea è di vedere se, tramite lo studio di questa specifica frazione dello zoobenthos di fondo mobile, possa essere perseguito l'obiettivo di riconoscere eventuali *patterns* riferibili ad alterazioni prodotte dalla posa della condotta *off-shore*.

Successivamente, poiché l'abbondanza degli Anfipodi, ed in particolare delle specie appartenenti al genere *Ampelisca*, è risultata particolarmente elevata, è stato molto interessante avviare un'ulteriore indagine su questo gruppo. Lo scopo iniziale del nostro lavoro di Tesi è stato, infatti, ampliato quando si sono osservati i primi risultati delle analisi ecologiche.

Come primo obiettivo, dunque, di questa seconda parte del lavoro, è stata analizzata in maniera più approfondita la struttura del popolamento ad *Ampelisca*, in relazione agli eventuali effetti prodotti su tale comunità dalla posa della condotta *off-shore*.

Secondariamente, poiché le specie appartenenti a tale genere sono organismi di piccole dimensioni (max 12-15 mm), la cui determinazione si basa sull'osservazione di caratteri morfologici quali antenne, urosomi, telson, presenza di piccole spine/peli, etc., capita sovente che l'organismo esaminato possieda buona parte dei caratteri diagnostici che la assocerebbero ad una specie, ma altri che la classificherebbero come diversa, generando confusione e portando ad un'identificazione dubbia. Pertanto, al fine di corroborare e supportare una corretta identificazione tassonomica a livello di specie, e non in ultimo anche la "curiosità" di comprendere l'effettiva diversità intra- ed inter-specifica di questo taxon, allo strumento classificatorio classico, basato sull'analisi di caratteri morfologici dell'animale, si è deciso di provare ad affiancare un ulteriore strumento di analisi formale, effettuando indagini di tipo genetico su un certo numero di specie appartenenti ad *Ampelisca*. La nostra attenzione si è concentrata sull'utilizzo del DNA mitocondriale, poiché particolarmente idoneo per lo studio del differenziamento dei taxa; in particolare è stato indagato il gene della Citocromo Ossidasi I che consente di effettuare indagini sui rapporti filogenetici tra i taxa.

Le analisi genetiche potranno chiarire se ci troviamo di fronte a specie polimorfiche o a più specie distinte, inoltre si procederà a confrontare individui raccolti durante le campagne nel Mar Adriatico con individui provenienti dal Mar Tirreno per verificare quale relazioni esistono tra le popolazioni dei due bacini.

In questo contesto l'approfondimento della tematica relativa alla tassonomia sistematica, supportata dall'analisi genetica, può rivelarsi prezioso ai fini dell'identificazione delle diverse specie appartenenti alla comunità bentonica, in quanto potrebbe ottimizzare la strategia di campionamento ed analisi del benthos, in un contesto di monitoraggio ambientale "routinario".

Ad oggi è stato verificato che non è stato ancora approntato uno studio di questo tipo, nei nostri mari, che in modo esaustivo qualifichi la struttura dei popolamenti a Crostacei Peracaridi, popolamenti tra i più importanti nel comparto bentonico in termini qualitativi e quantitativi.

Tale studio potrebbe avere carattere "pionieristico", ovvero successivamente si potrebbe allargare il quadro di indagine ai principali taxa macrozoobentonici, molti dei quali ancora attendono un'analisi sistematico-tassonomico più attenta ed approfondita.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Inquadramento area di studio

L'area di studio è parte integrante della piattaforma continentale dell'alto Adriatico ed è situata tra le foci del Po di Levante, a Nord, e la foce del Po di Maistra, a Sud, a largo della costa veneta (Figura 3.1).

L'area di posa della condotta *offshore* interessa il tratto di fondale che si estende dalla costa sino all'area di installazione del Terminale a una distanza dalla costa di circa 15 km , dove si raggiunge una profondità di circa 29 m.

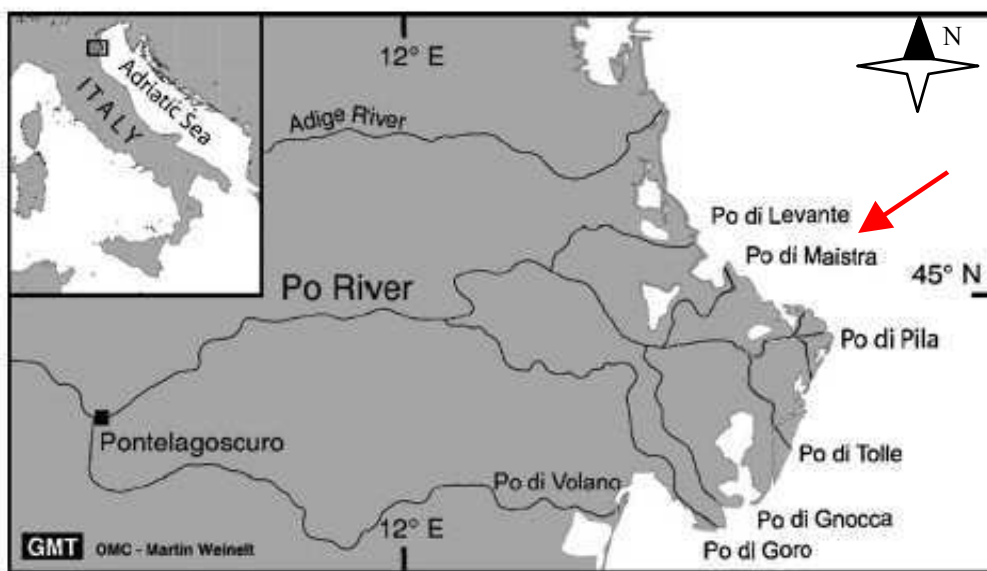


Figura 3.1- Area di studio siti di posa della condotta *off-shore* e del Terminale GNL (Alto Adriatico).

Il Mar Adriatico è lungo circa 800 km e largo da 90 km a 200 km e presenta una notevole variabilità delle condizioni meteo-marine, è inoltre un bacino epicontinentale semi-chiuso, con una piattaforma a bassissima pendenza nei settori settentrionale e centrale e un maggiore gradiente nel settore meridionale (Correggiani et al., 1996).

Nell'Alto Adriatico la fascia marina costiera è caratterizzata da sabbie, per la maggior parte di origine fluviale, che costituiscono la naturale prosecuzione delle sabbie emerse (sabbie costiere). A

profondità maggiori di 8-10 m si passa a una estesa fascia a granulometria molto fine costituita da limi argillosi. Spostandosi verso il largo, si passa da un sedimento limoso a sabbie e sabbie-argillose (sabbie relitte di piattaforma).

Le biocenosi di macroinvertebrati bentonici dell'Alto Adriatico si susseguono in fasce con andamento parallelo alla costa, secondo la distribuzione dei sedimenti, essendo la granulometria un parametro ecologico fondamentale per il benthos di fondi mobili. Si parte dalle spiagge sabbiose occidentali, procedendo con la fascia limosa, poi la zona di transizione con sabbia limosa, limo sabbioso e loam, e infine con i fondi prevalentemente fangosi del largo (secondo classificazione di Shepard, 1954).

A ridosso delle coste sabbiose troviamo la biocenosi delle Sabbie Fini Superficiali (SFS).

I substrati incoerenti infralitorali sono popolati dalla biocenosi delle Sabbie Fini Ben Calibrate (SFBC), contraddistinta dalla grande presenza di molluschi bivalvi, e in quest'area in particolare da *Chamelea gallina* (zoocenosi *Chione gallina* di Vatova, 1949).

Alcuni Autori, inoltre, indicano la sequenza SFBC-DCE, biocenosi delle Sabbie Fini Ben Calibrate e biocenosi del Detritico Infangato, (Peres&Picard, 1964).

3.2 Piano di campionamento

Il prelievo dei campioni di macrozoobenthos, per le analisi ecologiche, è avvenuta in tre periodi differenti: durante il mese di Agosto 2006 (Campagna A *di bianco*) prima della posa della condotta *offshore*, ad Agosto 2008 (campagna B *di cantiere*) una seconda campagna, subito dopo la fine dei lavori di posa ed infine un ultimo prelievo un anno dopo la fine dei lavori a Settembre 2010 (campagna E *di esercizio*) quando il Terminale e la condotta hanno iniziato la loro attività.

Le 10 stazioni (3, 7, 10, 13, 16, 19, 23, 27, 29, 31) per le analisi sia biotiche che abiotiche del sedimento sono state posizionate lungo il tracciato della condotta, le attività di prelievo si sono svolte a bordo del *R/V Astrea* dell'ISPRA (Figura 3.2.1), mentre per la stazione più costiera 3 è stato utilizzato un mezzo nautico d'ausilio.

La figura 3.2.2 mostra la posizione della condotta dalla costa fino al Terminale GNL, mentre nelle figure (3.2.3, 3.2.4, 3.2.5) successive sono mostrate le stazioni in dettaglio.

La tabella I mostra le stazioni, la loro distanza dalla costa e le profondità.

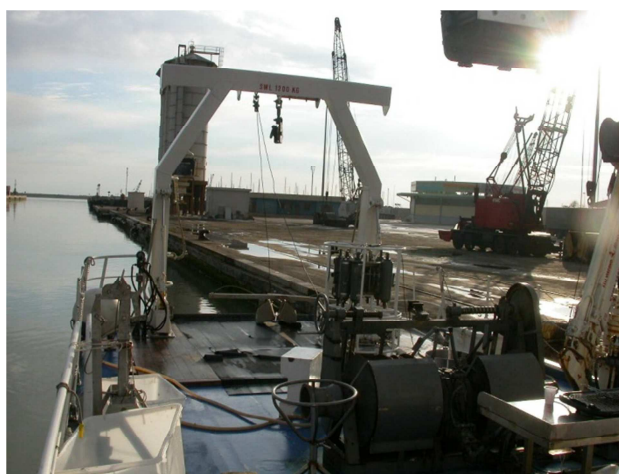


Figura 3.2.1 - Veduta dell'area di lavoro a poppa della *N/O Astrea*.

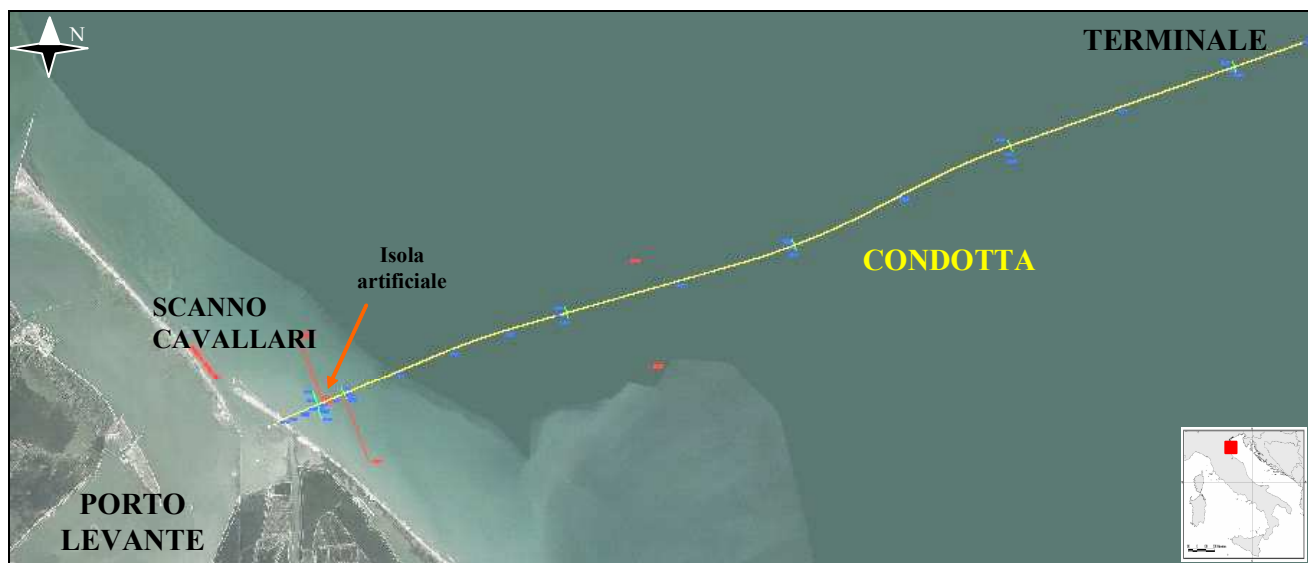


Figura 3.2.2 - Tracciato della Condotta *off shore* sottomarina di collegamento al Terminale GNL.

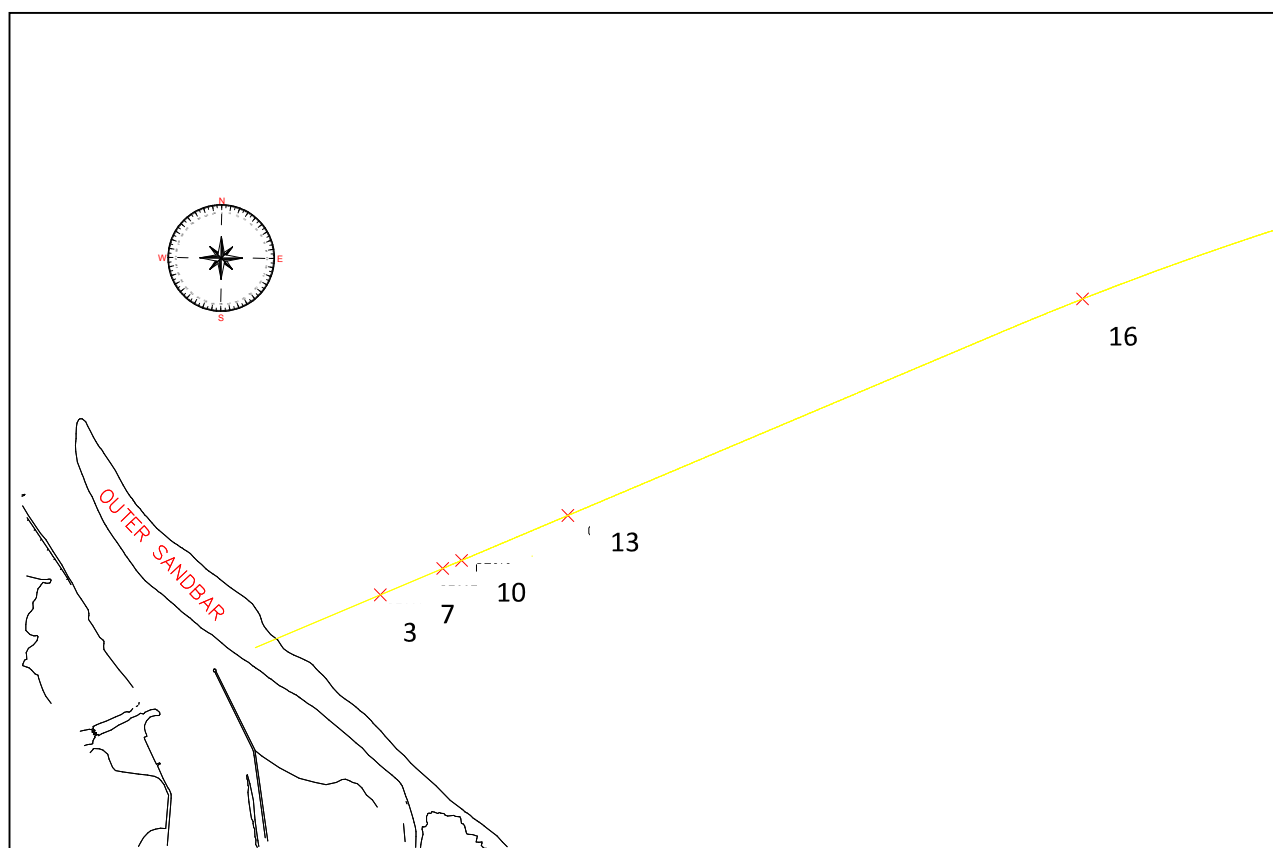


Figura 3.2.3 - Posizione delle stazioni di campionamento lungo il tracciato della Condotta. (dalla stazione 3 alla 16).

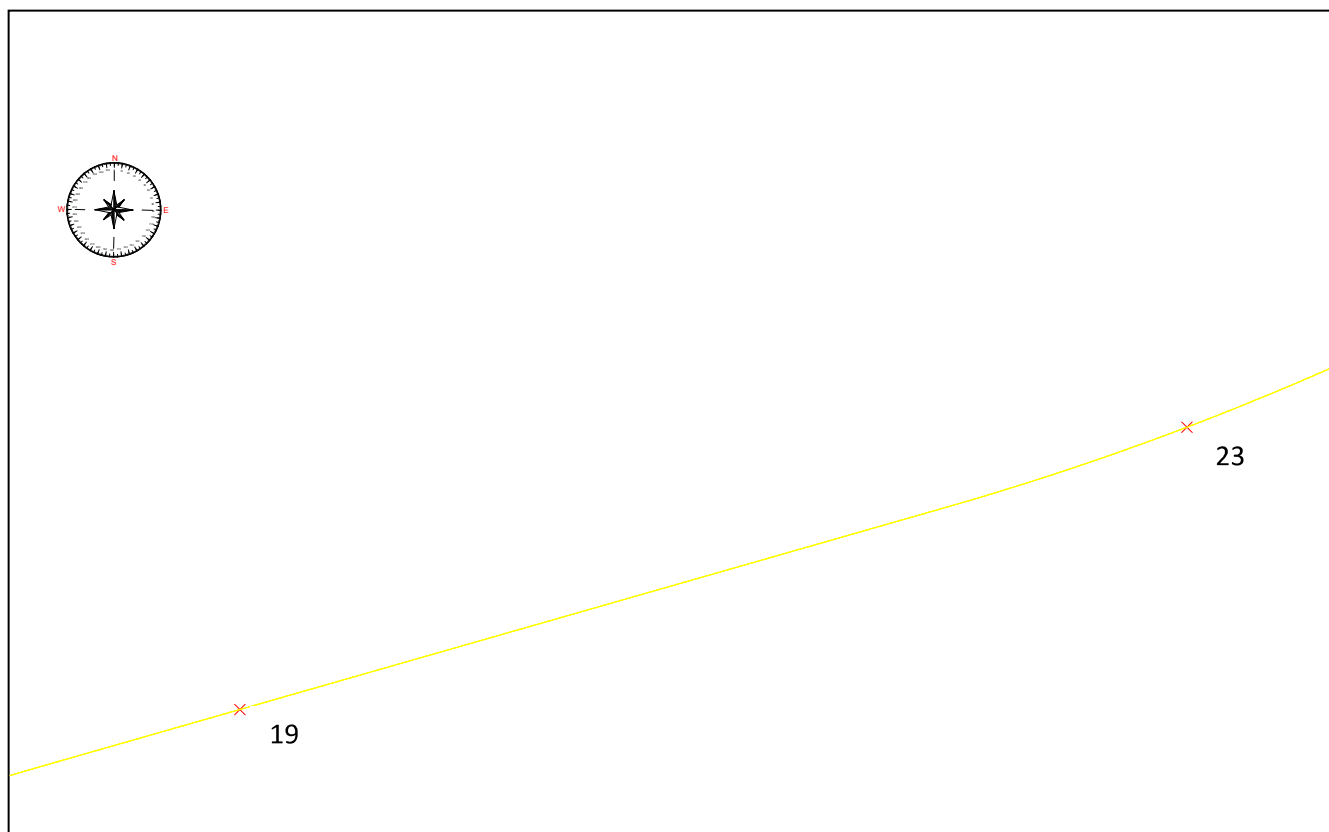


Figura 3.2.4 - Posizione delle stazioni di campionamento lungo il tracciato della condotta. (dalla stazione 19 alla 23).

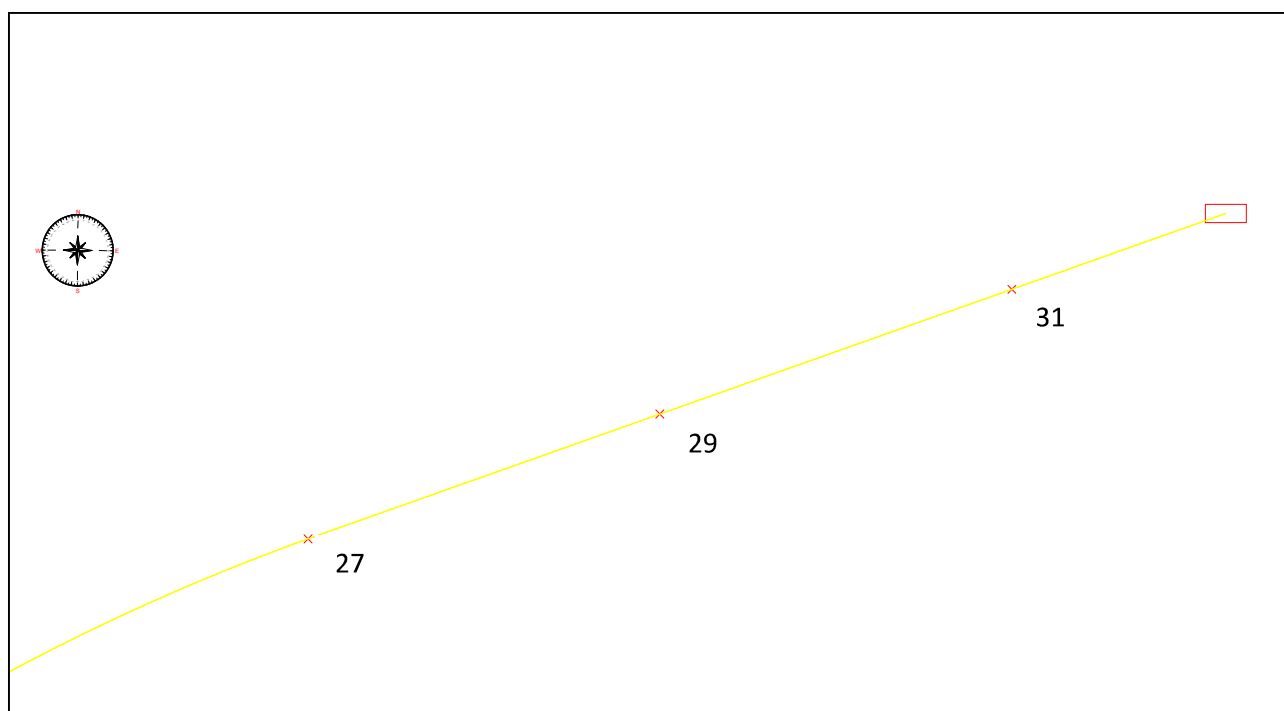


Figura 3.2.5 - Posizione delle stazioni di campionamento lungo il tracciato della condotta. (dalla stazione 27 alla 31).

Tabella I - Elenco delle stazioni con relativa distanza dalla costa, dal Terminale e batimetria.

Stazione	Posizione (m)	Prof. (m)
3	400m da costa	2,8
7	600m da costa	3,4
10	660m da costa	4
13	1000m da costa	5
16	Circa 2650m da costa	12
19	Circa a 4290m da costa	18,2
23	Circa a 7500m da costa	26
27	Circa a 10800m da costa	28
29	Circa 12500m da costa	28
31	Circa a 14800m da costa	28,5

Il sedimento per le analisi del popolamento bentonico, è stato campionato con una benna Van Veen con area di presa di 0,1 m² ed una capacità di 25 litri, prelevando in ogni stazione due repliche. Gli organismi del macrozoobenthos sono stati immediatamente separati dal sedimento tramite risciacquo in acqua marina corrente su un setaccio con maglia di 1 mm (Figura 3.2.6) e la frazione trattenuta è stata fissata in una miscela di acqua di mare e formaldeide al 4% tamponata con CaCO₃, conservata in contenitori di polietilene, etichettati con il nome della stazione, il numero della replica e la data.

Si è proceduto all'attività di *sorting*, una volta giunti in laboratorio, gli organismi appartenenti ai taxa dei Policheti, Molluschi, Crostacei ed Echinodermi sono stati separati dal sedimento e successivamente identificati al più basso livello tassonomico possibile (la specie per la maggior parte degli esemplari), mediante osservazione con stereomicroscopio binoculare e microscopio ottico, per l'identificazione sono state usate chiavi dicotomiche e bibliografia ecologico tassonomica.

Per le analisi genetiche sono stati raccolti esemplari di *Ampelisca* nel Mar Adriatico nel Luglio del 2012 (nelle medesime stazioni in cui sono stati raccolti i campioni per le analisi ecologiche) mentre gli organismi del Mar Tirreno sono stati campionati tra il 2010 ed il 2011 in un'area antistante le

coste laziali (Anzio) in Mar Tirreno, tra i 6 e i 39 metri.

In entrambe le aree le specie sono state raccolte e conservate in alcool 70% e identificate fino al livello di specie (Ruffo 1982), prima di effettuare le analisi genetiche.



Figura 3.2.6 - Benna Van Veen (0,1 m², 25 l) e setaccio con maglia 1mm.

I campioni per le analisi del sedimento (i primi 2 centimetri) sono stati raccolti e conservati in contenitori di plastica ad una temperatura ambiente per le analisi granulometriche, mentre per le analisi chimiche (sostanza organica totale) a -20°. Tutte le analisi granulometriche per la determinazione delle caratteristiche tessiturali del sedimento sono state eseguite dal Laboratorio di Sedimentologia dell'ISPRA, seguendo le metodiche riportate in Cicero e Di Girolamo (2001). Per le analisi dell contenuto di sostanza organica nel sedimento si è ricorso ad un metodo gravimetrico basato sulla perdita in peso (L.O.I., Loss on Ignition).

3.3Analisi ecologiche

Dell'intero popolamento bentonico le analisi sono state condotte solo per il Taxon dei Peracaridi, che nei nostri campioni è risultato essere formato da 4 Ordini: Anfipodi, Cumacei, Isopodi e Tanaidacei.

Per ciascuna stazione le repliche sono state accorpate ed attraverso una matrice specie x stazioni i dati sono stati elaborati con tecniche di analisi statistica uni e multivariata.

E stata calcolata l'abbondanza (A) e il numero di specie (S) ed i principali indici ecologici.

L'indice di Ricchezza specifica di Margalef (d) (Margalef, 1958), è funzione del rapporto tra il numero di specie totali ed il numero totale di individui. Quante più specie sono presenti nel campione, tanto più alto sarà il suo valore.

L'Equitabilità di Pielou (J) (Pielou, 1974) è compreso tra 0 ed 1 e prende in considerazione la distribuzione degli individui nell'ambito delle varie specie che compongono una comunità. Tale indice presenta il valore massimo nel caso teorico in cui tutte le specie siano presenti con la stessa abbondanza, mentre presenta valori bassi nel caso in cui ci sia una sola specie abbondante e numerose specie rare.

Infine l'indice di Diversità specifica di Shannon-Wiener (H'), (Shannon & Weaver, 1949) il cui valore è compreso tra 0 e teoricamente $+\infty$ che tiene conto sia del numero di specie presenti che del modo in cui gli individui sono distribuiti fra le diverse specie.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte sulla matrice di abbondanza specie x stazioni, del popolamento dei Peracaridi, i cui dati sono stati precedentemente trasformati con radice quadrata ed attraverso l'indice di Similarità di Bray Curtys (Bray & Curtis, 1957).

Per comprendere quali fattori influenzano il popolamento e se esistono interazioni tra di loro è stata effettuata l'analisi PERMANOVA (Anderson, 2001).

La procedura BIOENV (Clarke e Ainsworth, 1993) è stata condotta per ogni singola campagna (A, B ed E) ed applicata all'intero set di dati e sulla matrice relativa ai parametri ambientali normalizzati (granulometria e sostanza organica totale) al fine di valutare quali di essi contribuissero maggiormente all'ordinamento dei popolamenti. *Primer 6.1.6* (Clarke & Gorley, 2006).

L'analisi Canonica delle Coordinate Principali (CAP), è stata effettuata per distinguere la risposta del popolamento alla perturbazione, prima (A), durante (B) e dopo (E), e per valutare quali specie evidenziano questa differenziazione (Anderson & Robinson, 2003; Anderson & Willis, 2003).

L'analisi multivariata nMDS (*non-metric Multidimensional Scaling*) e la *Cluster analysis* (algoritmo del legame medio) sono state condotte attraverso il software *Primer 6.1.6* (Clarke & Gorley, 2006).

La Cluster analysis è una tecnica di classificazione che raggruppa i campioni in gruppi gerarchici sulla base della matrice di similarità.

Il metodo di MDS non metrico, è una tecnica di ordinamento che ha come punto di partenza una matrice triangolare di similarità tra campioni. L'algoritmo di MDS mappa i vari punti campione tramite il perfezionamento successivo delle loro posizioni affinché essi soddisfino il più possibile le relazioni di similarità o dissimilarità. Quindi se sul grafico il punto che rappresenta la stazione 1 appare più vicino al punto che rappresenta la stazione 2, rispetto a quello che rappresenta la stazione 3, questo implica che nella matrice di similarità originale 1 risulta più simile a 2 che non a 3. Non esiste però proporzionalità tra la distanza geometrica dei punti e l'effettivo valore del coefficiente di similarità. Il grado di corrispondenza tra la matrice di similarità e la disposizione dei punti nel diagramma MDS si misura tramite un Coefficiente di Stress.

Le analisi delle caratteristiche granulometriche sono state effettuate seguendo la scala di Udden-Wentworth (sabbia: 2mm - 63 μ m, limo: 63 - 4 μ m, argilla: <4 μ m).

3.4Analisi genetiche

Lo screening genetico è stato condotto sugli esemplari del genere *Ampelisca* identificate fino al livello di specie su base morfologica (Ruffo 1982, 1989, 1993), prima di effettuare le analisi genetiche.

Sono stati presi in considerazione 13 individui provenienti dal Mar Adriatico e 23 dal Mar Tirreno, è stato scelto come marcatore molecolare il gene Citocromo Ossidasi I (COI), per il quale sono noti primer universali che si sono dimostrati affidabili nell'amplificare DNA di crostacei ed anfipodi (Folmer et al., 1994).

Il Dna è stato estratto da ogni individuo usando il metodo C-TAB/phenol-chloroform (Doyle & Doyle 1987) parzialmente modificato.

E' stato amplificato, tramite PCR, un frammento parziale della regione COI costituito da 525 bp grazie ai primer COIF 5' TGATAGTAACAGCTCATGCT 3' e HCO 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' (reverse) (Folmer et al., 1994).

La reazione della PCR è stata condotta su un volume di 25 µl contenenti 20ng di templat, 2.5µl di tampone di reazione 10x, 3µl di MgCl₂, 0.5µl di dNTP, 5 pmol/L per ogni primer e una unità di *Taq* DNA polymerase (Promega).

Inizialmente le PCR sono state condotte con un ciclo di denaturazione di 1 minuto, seguito da 40 cicli da 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48°C, 1.5 minuti a 72°C e un ciclo finale di estensione da 10 minuti a 72°C.

I prodotti della PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1.8% mediante bromuro di etidio allo 0.01%; i prodotti sono stati successivamente purificati e il sequenziamento è stato affidato a una ditta esterna (Macrogen Europa).

Le sequenze ottenute sono state verificate con Chromas 2.13 (McCarthy-Technelysium Pty.) e allineate usando Clustal_X 1.83 (Thompson et al., 1997); la correttezza dell'allineamento è stata poi verificata al livello degli amminoacidi.

Alcuni degli aplotipi osservati per gli individui del Tirreno sono disponibili su GenBank (numeri di accesso JQ653138-49, JX100837-39).

La diversità aplotipica e nucleotidica è stata calcolata usando il software DnaSP v.5 (Rozas et al., 2003), mentre le distanze genetiche sono state calcolate usando l'algoritmo Kimura-2-parametri (K2P) sono state calcolate mediante il programma MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2000); tale distanza è stata usata per ottenere l'albero filogenetico Neighbour-Joining calcolato su 10000 repliche di bootstrap. Per riuscire a determinare la struttura genetica osservata a livello mitocondriale nelle

popolazioni è stato utilizzato principalmente il metodo statistico F_s di Fu (Fu, 1997), il quale valuta la presenza di mutazioni recenti (e perciò anche di alleli rari) rispetto a quella attesa in condizioni di equilibrio. La selezione in atto o un'espansione demografica della popolazione potrebbero generare un eccesso di tali mutazioni, rilevabili da valori negativi e significativi di F_s . Allo scopo di valutare la significatività del valore ottenuto, è stata generata una distribuzione empirica del parametro, con il programma DnaSP, tramite simulazioni basate sul processo di coalescenza, software ARLEQUIN 2.0 (Shneider *et al.*, 2000).

Utilizzando questo software è stata eseguita l'analisi molecolare della varianza (AMOVA). L'AMOVA è uno strumento utile per verificare come sia distribuita la variabilità genetica tra popolazioni, utilizzando le distanze molecolari dei diversi aplotipi. L'AMOVA produce stime delle componenti della varianza ed analoghi dell' F -statistico, designati come Q -statistico, che riflettono la correlazione dei diversi aplotipi per i differenti livelli di suddivisione della popolazione (individui, popolazioni e gruppi di popolazioni). La significatività dei componenti della varianza (e quindi la distanza genetica) e del Q -statistico viene testata usando 1000 o 10000 permutazioni dei dati di partenza (Excoffier *et al.*, 1992). La struttura della popolazione è quantificata da un termine statistico noto come F_{st} . Per valori di F_{st} compresi tra 0 e 0.01 si individua una assente o piccola divergenza tra le popolazioni, per valori superiori a 0.1 vi è una grande divergenza.

Come outgroup è stata usata una sequenza di COI del Crostaceo Decapode *Scylla olivacea* (GenBank accession number: JQ062904.1)

4.RISULTATI

4.1 Risultati analisi ecologiche

4.1.1 Parametri ambientali

Le caratteristiche del sedimento dell'area investigata sono mostrate nelle figure 4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.3: nella **campagna A** si osserva come in tutte le stazioni, ad eccezione di A19 e A23 la percentuale della componente sabbiosa è superiore al 70 %, raggiungendo valori intorno al 90% nelle stazioni A03, A07, A10 e A13; la componente limosa invece è minima (< 5%) nelle stazioni a profondità inferiori ai 18 metri, fatta eccezione per A13 in cui si osserva una percentuale pari al 15%, nelle stazioni a maggiore profondità la percentuale oscilla tra di 10% e il 40%.

La componente argillosa segue lo stesso andamento di quella limosa.

La percentuale della sostanza organica totale nel sedimento presenta valori bassi in corrispondenza di elevate concentrazioni di sabbia, viceversa valori che raggiungono circa il 90% in corrispondenza di percentuali di limo ed argilla importanti.

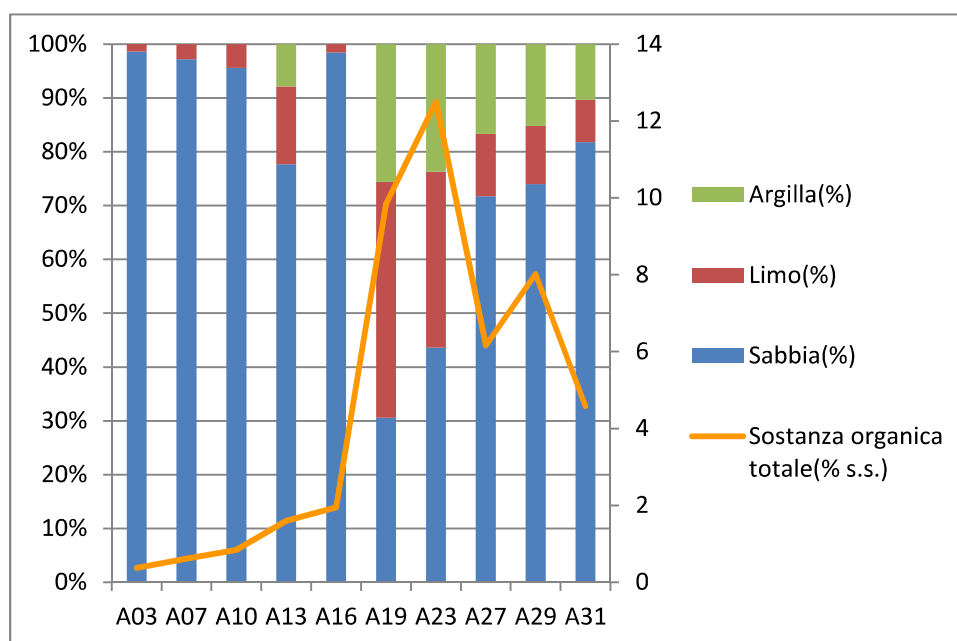


Figura 4.1.1.1 - Composizione granulometrica del sedimento della campagna A espresso in percentuale relativa. La linea mostra l'andamento della percentuale di sostanza organica totale.

Nella figura 4.1.1.2 sono mostrate le caratteristiche del sedimento relativo alla **campagna B**: tutte le frazioni granulometriche mostrano dei cambiamenti rispetto alla campagna A, la componente sabbiosa è superiore al 80% solo nelle stazioni B03, B07 e B16, in tutte le altre oscilla tra una percentuale minima di 13% ad una massima di 63%; viceversa la componente limosa è elevata. La percentuale di argilla e la concentrazione di sostanza organica totale seguono l'andamento della componente limosa.

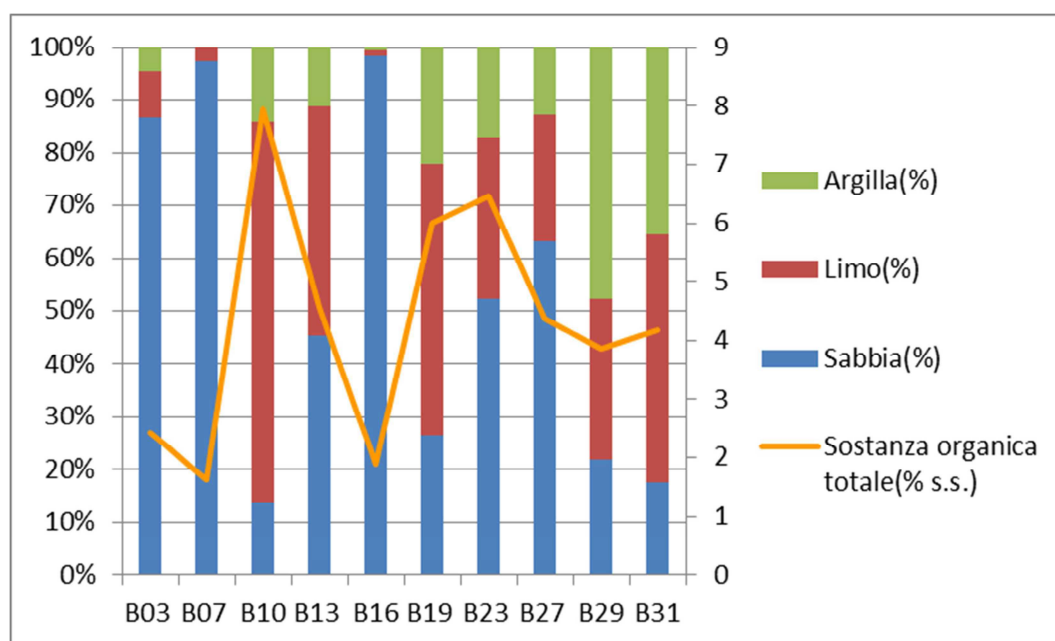


Figura 4.1.1.2 - Composizione granulometrica del sedimento della campagna B espresso in percentuale relativa. La linea mostra l'andamento della percentuale di sostanza organica totale.

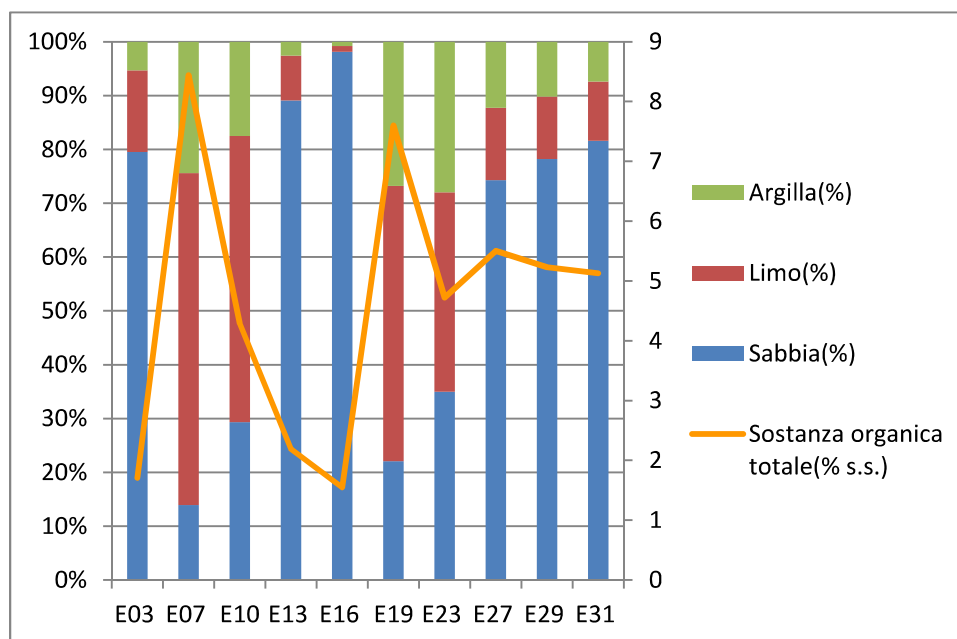


Figura 4.1.1.3 - Composizione granulometrica del sedimento della campagna E espresso in percentuale relativa. La linea mostra l'andamento della percentuale di sostanza organica totale.

Nella **campagna E** (Fig. 4.1.1.3) la componente sabbiosa tende a aumentare nuovamente, raggiungendo nella maggior parte delle stazioni valori superiori al 70%. Nelle stazioni E07, E10, E19 ed E23, si osserva un elevato valore della componente limosa.

In questa campagna la componente organica si presenta simile a quella osservata per le altre campagne: elevati valori nelle stazioni in cui vi è elevata componente più fine; fa eccezione, in tutte e tre le campagne, la stazione 16, in cui la % di sostanza organica è sempre piuttosto bassa.

4.1.2 Popolamento Peracaridi

In tutte e tre le campagne sono presenti 661 individui appartenenti ad 51 specie, e a quattro Ordini: Cumacei, Tanaidacei Isopodi ed Anfipodi.

In tutte le campagne il Taxon degli Anfipodi risulta essere quello più abbondante sia per il numero di individui che per le specie.

Nella figura 4.1.2.1 sono confrontati i valori delle abbondanze e del numero di specie nelle tre campagne (A, B ed E).

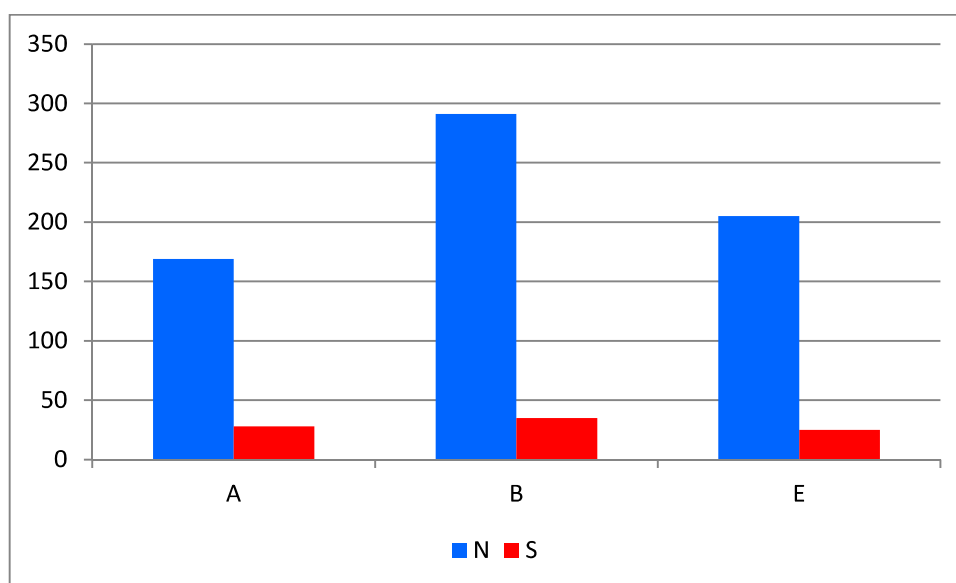


Figura 4.1.2.1 - Abbondanza (N) e Numero di Specie (S) osservate nelle campagne A, B ed E.

Il valore dell'abbondanza subisce un incremento durante la campagna B (291 individui), in corrispondenza delle attività di movimentazione del sedimento, per poi tornare a diminuire (Campagna E 205) e raggiungere valori più o meno simili a quello osservati durante la campagna A (169). Il numero delle specie invece rimane piuttosto simile subendo un lieve incremento nella campagna B (30).

Nella Fig. 4.1.2.2 si osserva come gli Anfipodi sono il gruppo maggiormente rappresentato in tutte e tre le campagne, essi costituiscono circa il 90% dell'intero popolamento esaminato. Tale abbondanza è dovuta prevalentemente alle specie *Ampelisca* (famiglia Ampeliscidae), segue il

taxon dei Cumacei. Gli Isopodi mostrano un lieve aumento dei valori di abbondanza dalla campagna A alla campagna E, i Tanaidacei mostrano il massimo valore nella campagna B.

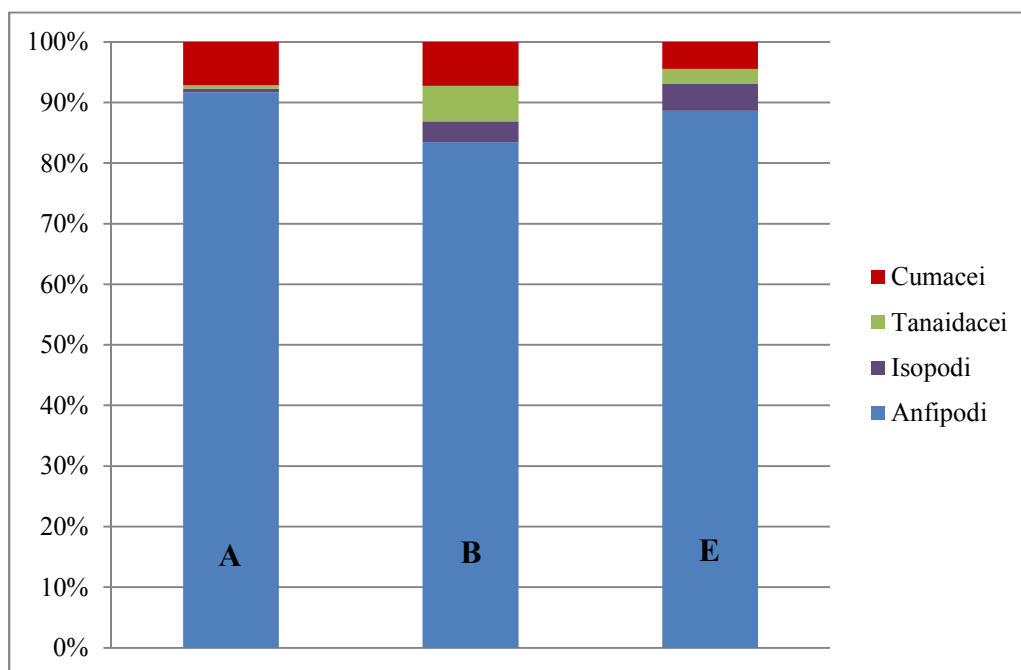


Figura 4.1.2.2 - Percentuale di Abbondanza dei quattro Ordini di Peracaridi (Cumacei, Tanaidacei, Isopodi ed Anfipodi) osservate nelle campagne A, B ed E.

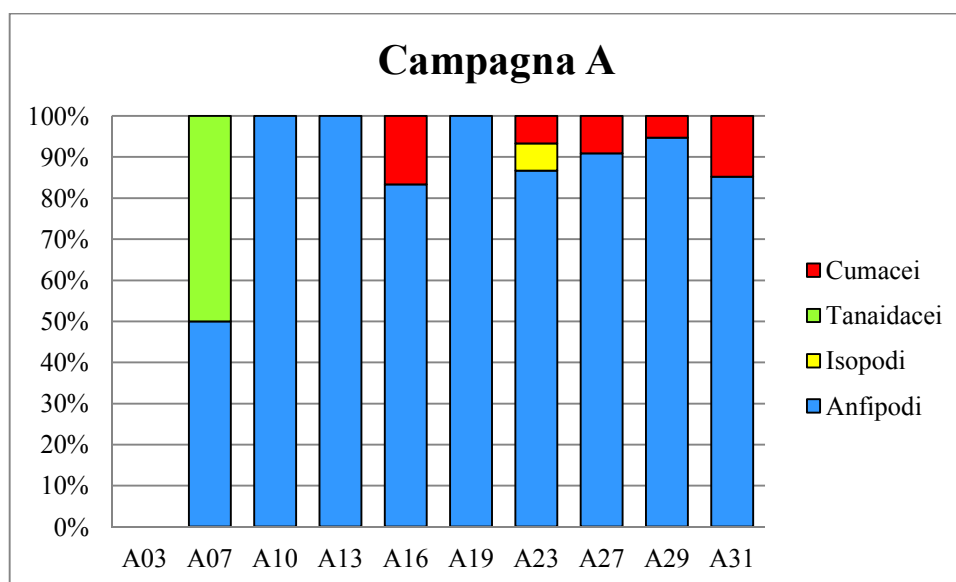


Figura 4.1.2.3 - Percentuali dei taxon che caratterizzano ogni stazione osservati nella campagna A.

Le specie di Peracaridi ritrovate nella campagna A sono state raggruppate in base all'Ordine tassonomico di appartenenza: la figura 4.1.2.3 mostra i risultati per ogni singola stazione.

Il gruppo degli Anfipodi risulta essere il più abbondante nella maggior parte delle stazioni, ad eccezione della stazione A03 dove non sono stati ritrovati peracaridi e A07 dove il restante 50 % è costituito dai Tanadacei; mentre solo nella stazione A23 compare il taxa degli Isopodi.

Il popolamento rinvenuto durante la campagna B mostra il taxon degli Anfipodi come il più abbonadante in tutte le stazioni, ad eccezione della stazione B07 dove nessun individuo è stato rinvenuto; sono inoltre presenti sia i Cumacei che gli Isopodi in molte stazioni (Fig. 4.1.2.4).

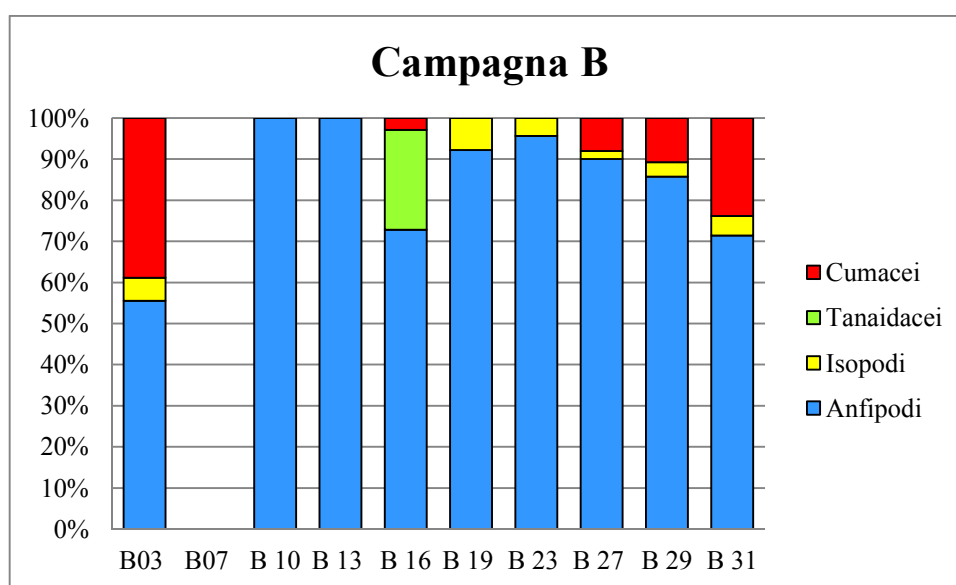


Figura 4.1.2.4 - Percentuali dei taxon che costituiscono ogni stazione osservati nella campagna B.

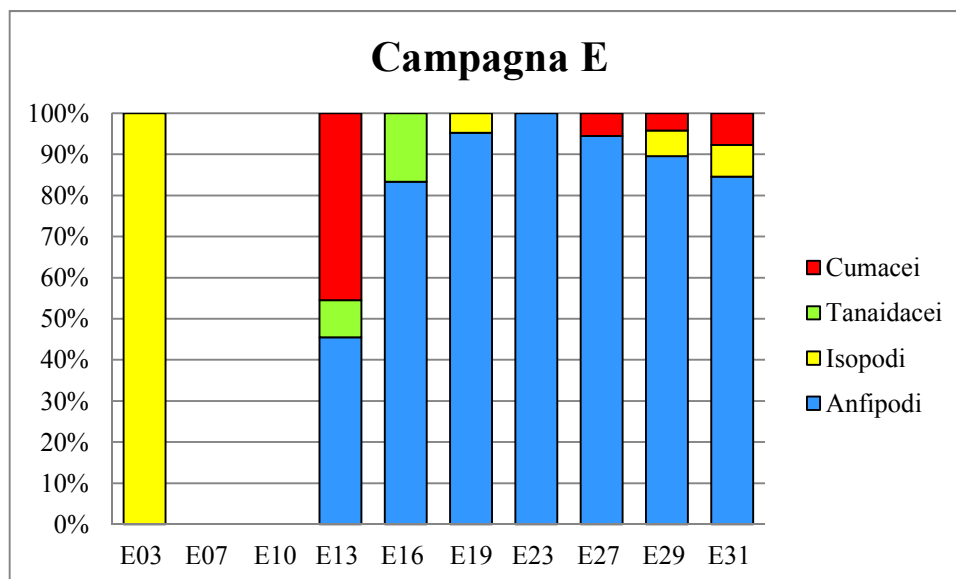


Figura 4.1.2.5 - Percentuali dei taxon che costituiscono ogni stazione osservati nella campagna E.

Il popolamento osservato durante la campagna E (Fig. 4.1.2.5) mostra l'assenza di individui sia nella stazione E07 (come nella campagna B) che in E10.

La stazione E03 è costituita dal solo taxon degli Isopodi, mentre nelle altre stazioni gli Anfipodi sono il taxon più abbondante, ad eccezione della stazione E13 in cui circa il 50% del popolamento è costituito da Cumacei.

Per poter meglio comprendere se la struttura del popolamento ha subito delle alterazioni sono di seguito riportati i valori dei principali indici ecologici calcolati in ogni per ogni stazione.

I valori dell'abbondanza N (Fig. 4.1.2.6) mostrano un generale incremento da costa verso il largo in tutte e tre le campagne.

Per quanto riguarda le stazioni poste a profondità inferiori ai 5 metri, si osserva una similitudine dei valori di N in A B e E, mentre a profondità maggiori i valori osservati per la campagna B sono sempre maggiori rispetto a quelli registrati in A; infine per la campagna E si osservano stazioni in cui si registra il valore più alto rispetto alle altre due campagne e stazioni in cui è il più basso (23 e 31).

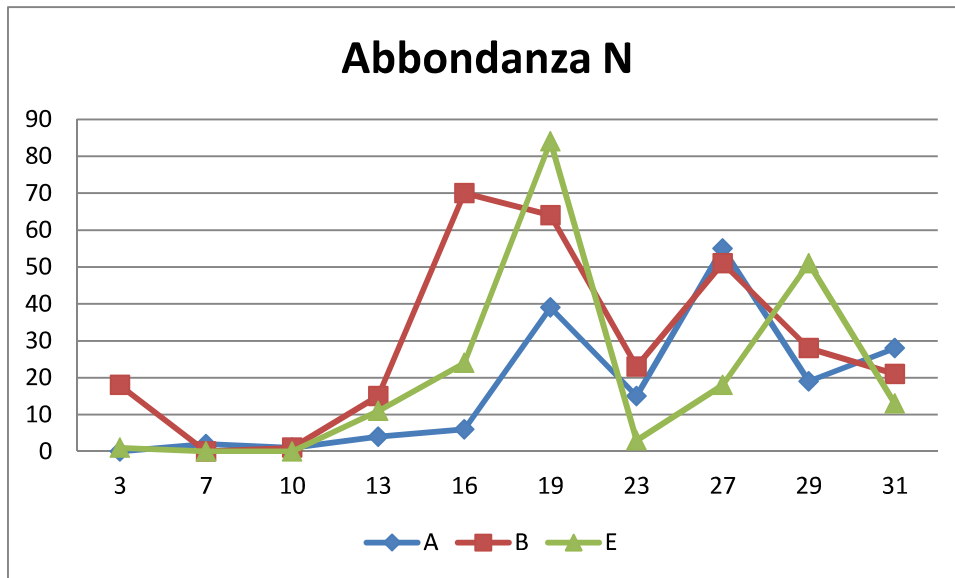


Figura 4.1.2.6 - Valori dell'Abbondanza (N) osservati in tutte le stazioni per ogni campagna (A, B e E).

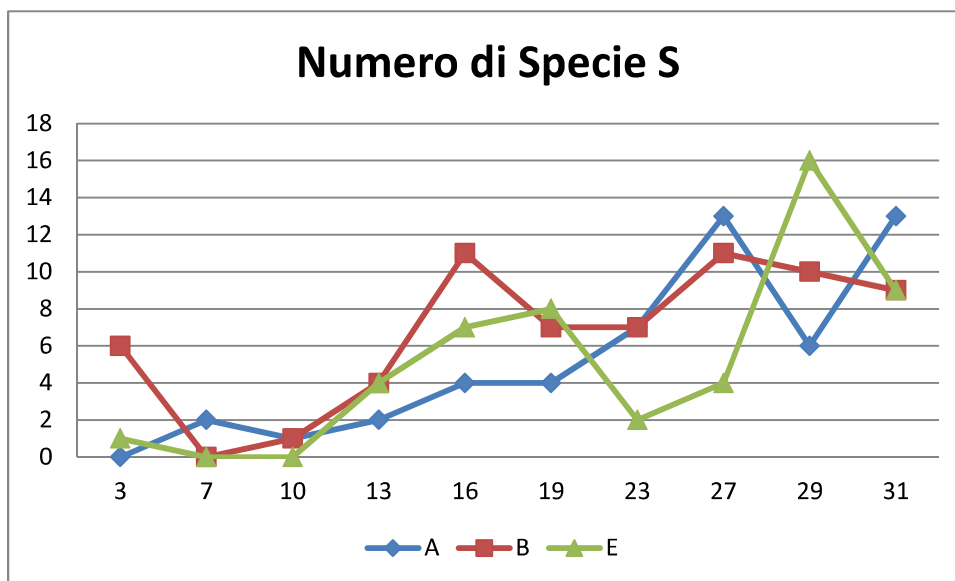


Figura 4.1.2.7 - Valori del Numero di Specie (S) osservati in tutte le stazioni per ogni campagna (A, B e E).

Il Numero delle Specie S (Fig. 4.1.2.7) mostra un progressivo aumento andando da costa verso largo per tutte e tre le campagne, l'andamento che si osserva per la campagna A appare il più

omogeneo rispetto a quello delle campagne B ed E anche se verosimilmente l'andamento dei valori della campagna E ricalca meglio quello osservato per A.

L'indice di Margalef (d) (Fig. 4.1.2.8) mostra un andamento di valori crescenti da costa verso largo in tutte e tre le campagne, inoltre si osserva un andamento più omogeneo tra le tre campagne nelle stazioni 13, 16 e 19.

L'Equitabilità (J) (Fig. 4.1.2.9) mostra invece nelle tre campagne differenze tra le stazioni profonde meno di 5 metri (3, 7 e 10) e un'elevata omogeneità in tutte le altre.

Infine l'Indice di Diversità H' (Fig. 4.1.2.10) mostra un andamento analogo a quello osservato per l'indice di Margalef.

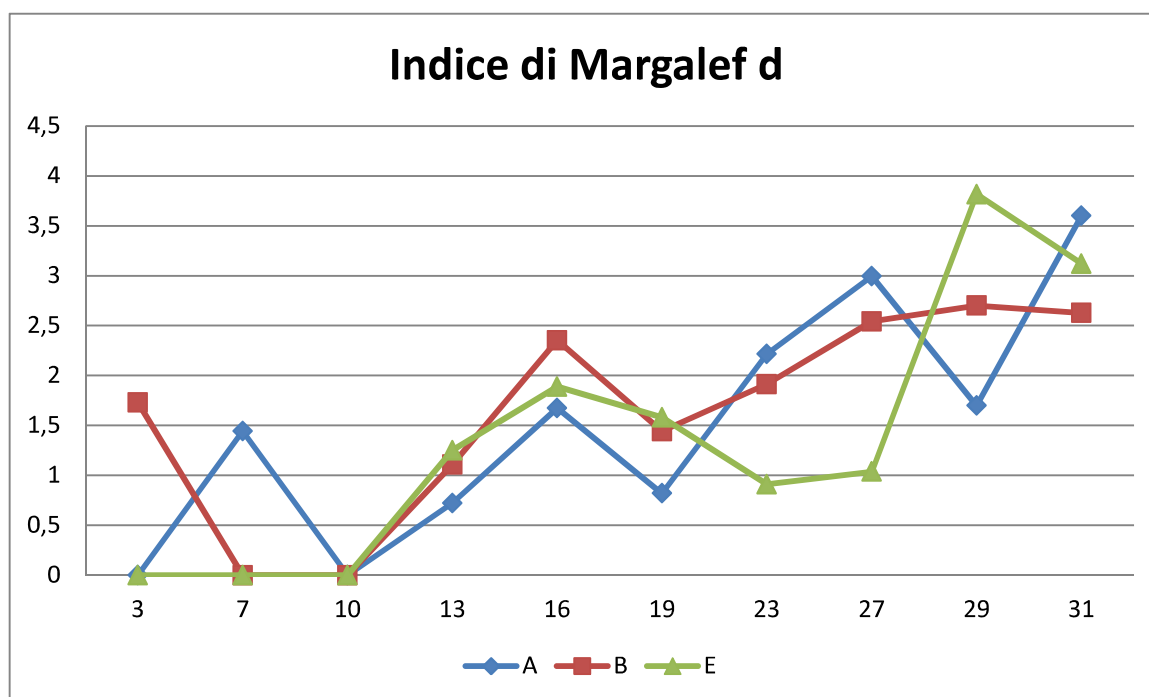


Figura 4.1.2.8 - Valori Indice di Margalef (d) osservati in tutte le stazioni per ogni campagna (A, B e E).

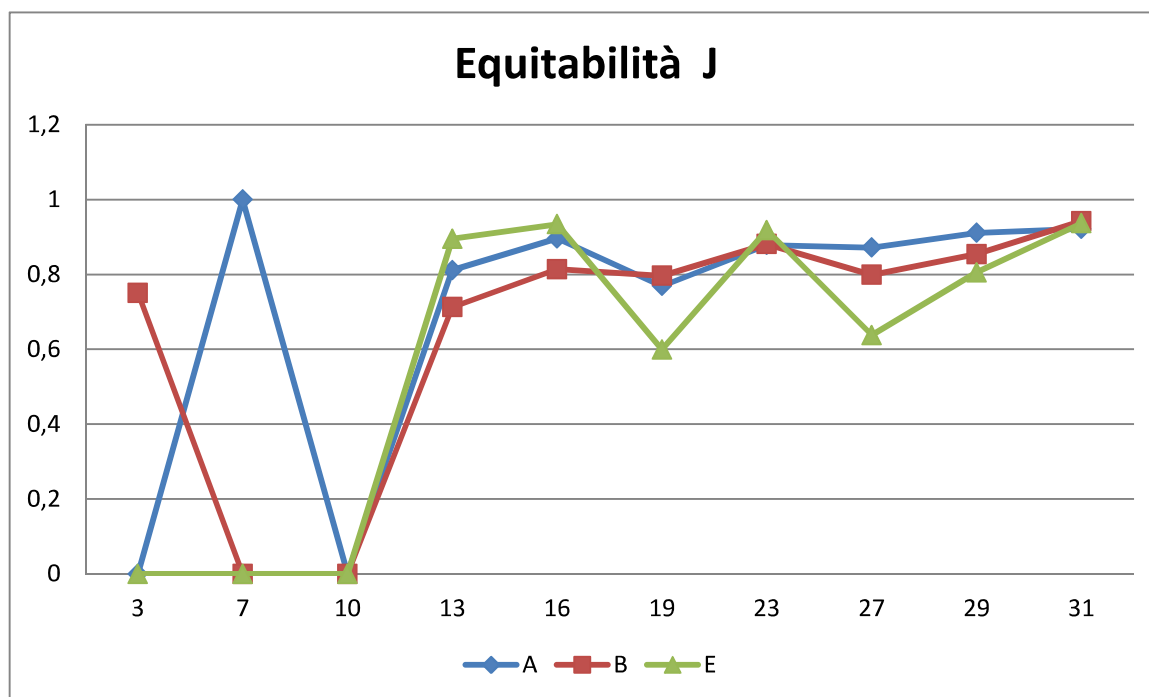


Figura 4.1.2.9 - Valori Indice Equitabilità (J) osservati in tutte le stazioni per ogni campagna (A, B e E).

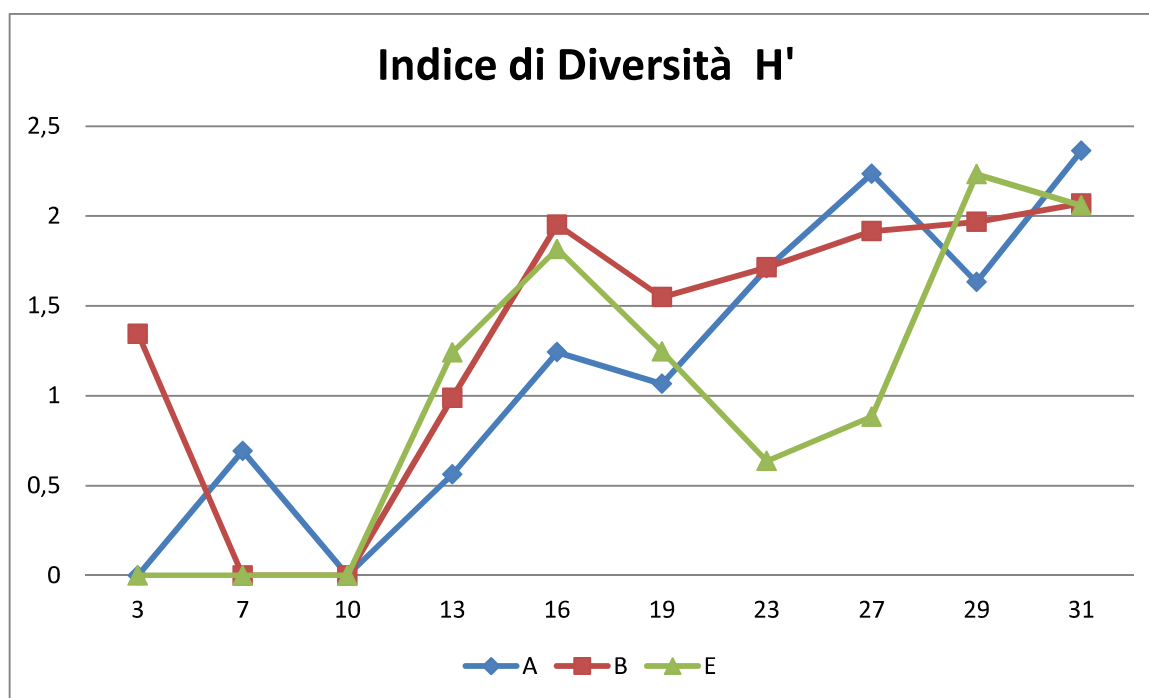


Figura 4.1.2.10 - Valori Indice di Diversità (H') osservati in tutte le stazioni per ogni campagna (A, B e E)

In tutte e tre campagne le specie dominanti appartengono alla famiglia delle Ampeliscidae a cui appartiene il genere *Ampelisca* (ordine Anfipodi) ed i relativi valori percentuali sono mostrati nelle figure 4.1.2.11, 4.1.2.12 e 4.1.2.13: per la campagna A la più abbondante è *Ampelisca sarsi*, seguita da *Ampelisca ind.*, *Ampelisca diadema*, *Ampelisca tenuicornis* ed *Ampelisca typica*, le altre specie, ad eccezione di *Iphinoe tenella* che è un Cumaceo, sono anfipodi.

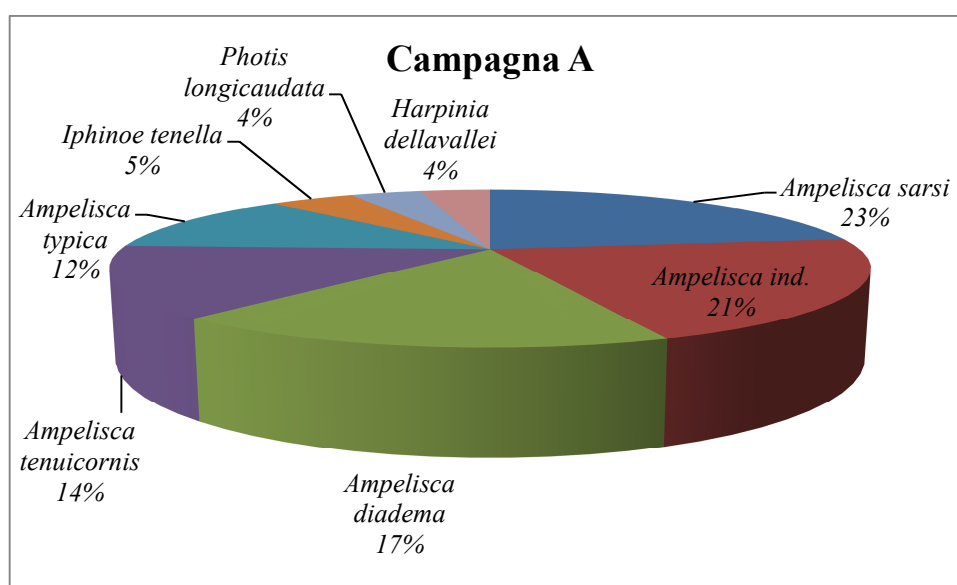


Figura 4.1.2.11 - Specie più abbondanti rinvenute nella campagna A.

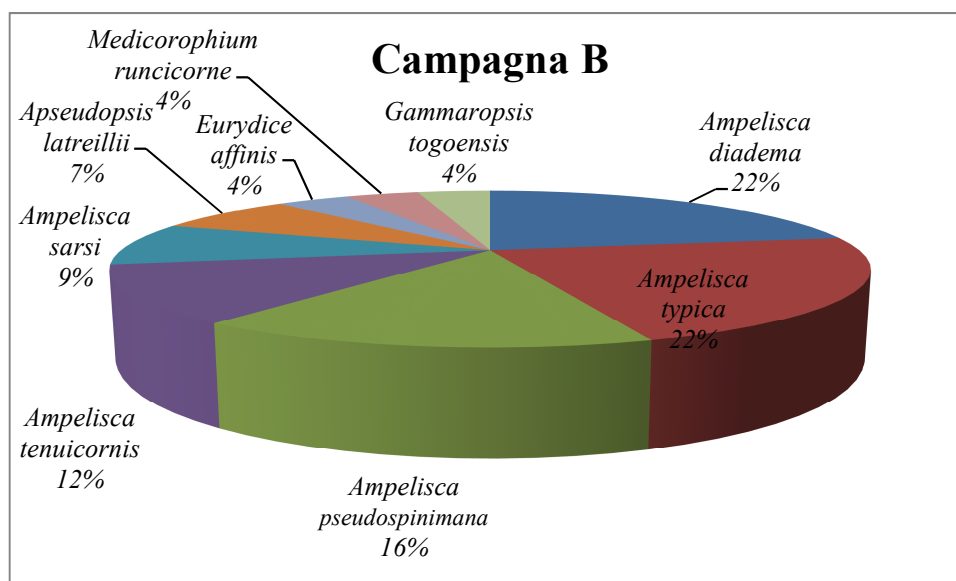


Figura 4.1.2.12 - Specie più abbondanti rinvenute nella campagna B

Anche nella Campagna B (Fig. 4.1.2.12) le specie più abbondanti appartengono prevalentemente alla famiglia delle Ampeliscidae: *Ampelisca diadema* e *Ampelisca typica* sono le più numerose, seguono *Ampelisca pseudospinimana*, *Ampelisca tenuicornis*, *Ampelisca sarsi*.

Troviamo inoltre il tanaidaceo *Apseudopsis latreillii*, l'isopode *Eurydice affinis*, ed altri anfipodi *Medicorophium runcicorne* e *Gammaropsis togoensis*.

Nella campagna E (Fig. 4.1.2.13) *Ampelisca sarsi* torna ad essere dominante, seguita da *Ampelisca diadema* e *Ampelisca tenuicornis*, in questa campagna tra le specie più abbondanti compare l'anfipode *Leucothoe serraticarpa*, segue *Ampelisca typica*, l'isopode *Eurydice affinis*, il cumaceo *Iphinoe trispinosa* e il tanaidaceo *Apseudopsis latreillii*.

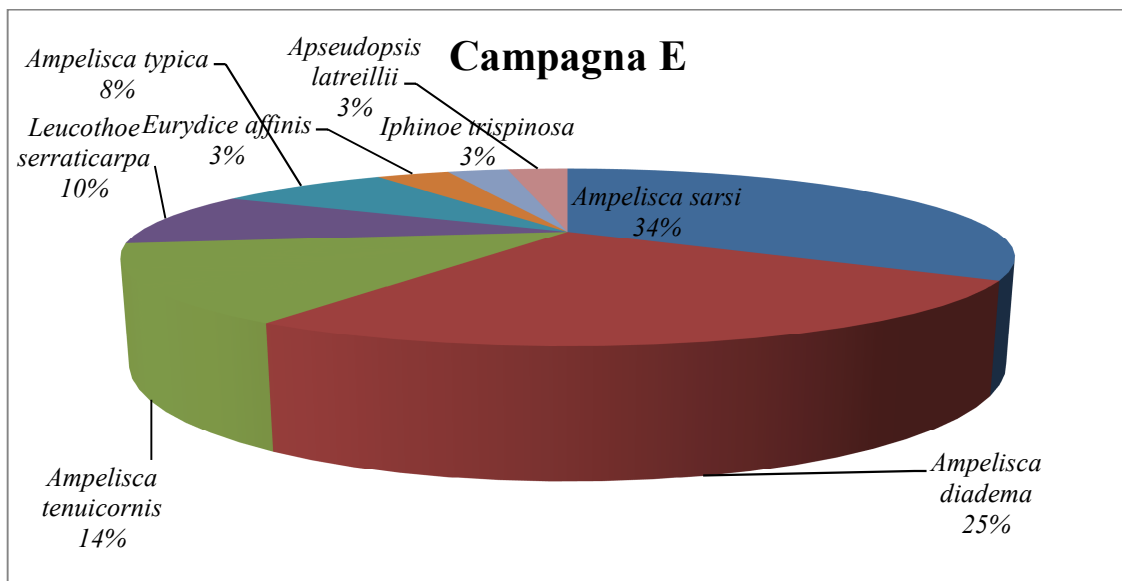


Figura 4.1.2.13 - Specie più abbondanti rinvenute nella campagna E

E' stata effettuata l'analisi della PERMANOVA per poter comprendere quali sono i fattori che, combinandosi tra di loro, producono la relazione più significativa.

I fattori individuati sono le tre differenti campagne "before" (*bianco* campagna A), "during" (*cantiere* campagna B) e "after" (*esercizio* campagna E) e la profondità "shallow" (stazioni da 3 a 13, profondità inferiore a 5 metri) e "deep" (stazioni da 16 a 31, profondità superiore a 5 metri).

La PERMANOVA ha evidenziato che solo per i singoli fattori esistono differenze statisticamente significative ($p < 0,001$) (Tab. II) mentre per la loro interazione si osservano valori non statisticamente significativi.

Il confronto tra le campagne (A, B ed E) effettuato attraverso il Parwise Test (Tab III) mostra che le campagne A e B sono significativamente differenti (0,0026) e così come A ed E (0,0052).

Tabella II - Risultati dell'analisi PERMANOVA i fattori considerati sono la Campagne, Profondità e la loro interazione.

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Perms
Campagne	2	10981	5490,6	1,9007	0,0032	9888
Profondità	1	12665	12665	4,3842	0,0001	9925
CaxPr	2	7432,3	3716,1	1,2864	0,1403	9885

Tabella III - Risultati dell'analisi Pair Wise Test PERMANOVA in cui sono confrontate le tre campagne A, B ed E

Groups	T	P(perm)	perms
A - B	1,5013	0,0026	9919
A - E	1,4939	0,0052	9926
B - E	1,0869	0,2922	9931

Sono state condotte diverse analisi statistiche per comprendere in cosa e come i popolamenti si differenziano nelle tre diverse campagne: l'analisi BIOENV per comprendere quali sono i fattori abiotici a cui il popolamento è maggiormente legato, la CAP per capire quali sono le specie che distinguono ogni campagna.

Nelle seguenti tabelle sono riportati i risultati dell'analisi BIOENV effettuate nelle tre campagne A, B e E.

La Tabella IV mostra i risultati della campagna A in cui sono le variabili argilla e sostanza organica che presentano la correlazione più importante con il popolamento bentonico (Spearman rank Correlation 0,194).

Mentre nella successiva campagna B (Tab.V) tra le variabili che correlano il popolamento troviamo il gruppo costituito da limo e sostanza organica che mostrano un valore di correlazione pari a 0,396. Infine il popolamento della campagna E (Tab.VI) è prevalentemente correlato alla frazione granulometrica limosa (Spearman rank Correlation 0,321), segue il gruppo sabbia limo (Spearman rank Correlation 0,251).

Tabella IV - BIOENV risultati ottenuti analizzando le variabili biotiche e abiotiche della Campagna A.

Best Results Campagna A	Corr.	Selections
N°.Vars		
2	0,194	argilla; sostanza organica
3	0,171	sabbia; argilla; sostanza organica

Tabella V - BIOENV risultati ottenuti analizzando le variabili biotiche e abiotiche della Campagna B.

Best results Campagna B	Corr.	Selections
N°.Vars		
2	0,396	limo; sostanza organica
1	0,374	sostanza organica

Tabella VI - BIOENV risultati ottenuti analizzando le variabili biotiche e abiotiche della Campagna E.

Best results Campagna E	Corr.	Selections
N°.Vars		
1	0,321	limo
2	0,251	sabbia; limo

I popolamenti osservati nelle diverse campagne sono stati analizzati attraverso l'analisi Canonica delle Coordinate Principali (CAP), (autovalori asse 1 0.96 asse 2 0.81) come mostra la figura 4.1.2.14, in cui è stato usato come fattore discriminante tra le stazioni il periodo in cui sono state campionate (Date), inoltre sono mostrate le specie che più caratterizzano le diverse campagne.

Tra le specie che contraddistinguono la campagna A troviamo *Ampelisca brevicornis*., *Urothoe pulchella* e *Atylus massiliensis* che prediligono sedimenti sabbiosi, mentre *Leptocheirus mariae* è legata al sedimento più fine.

Le specie *Ampelisca pseudospinimana*, *Ampelisca ledoyeri* e *Iphinoe serrata*, caratterizzano la campagna B, ed appartengono alla biocenosi del Detritico Infangato (DE), mentre il cumaceo *Cumopsis goodsiri* vive in sedimenti di sabbia fangosa, l'anfipode *Gammaropsis togoensis* predilige le sabbie mediolitorali.(SM).

Infine le specie *Orchomene humilis* e *Iphinoe trispinosa*, caratterizzano la campagna E, esse prediligono rispettivamente fondi con alghe e spugne la prima e la biocenosi delle Sabbie Fini Ben Calibrate (SFBC) la seconda.

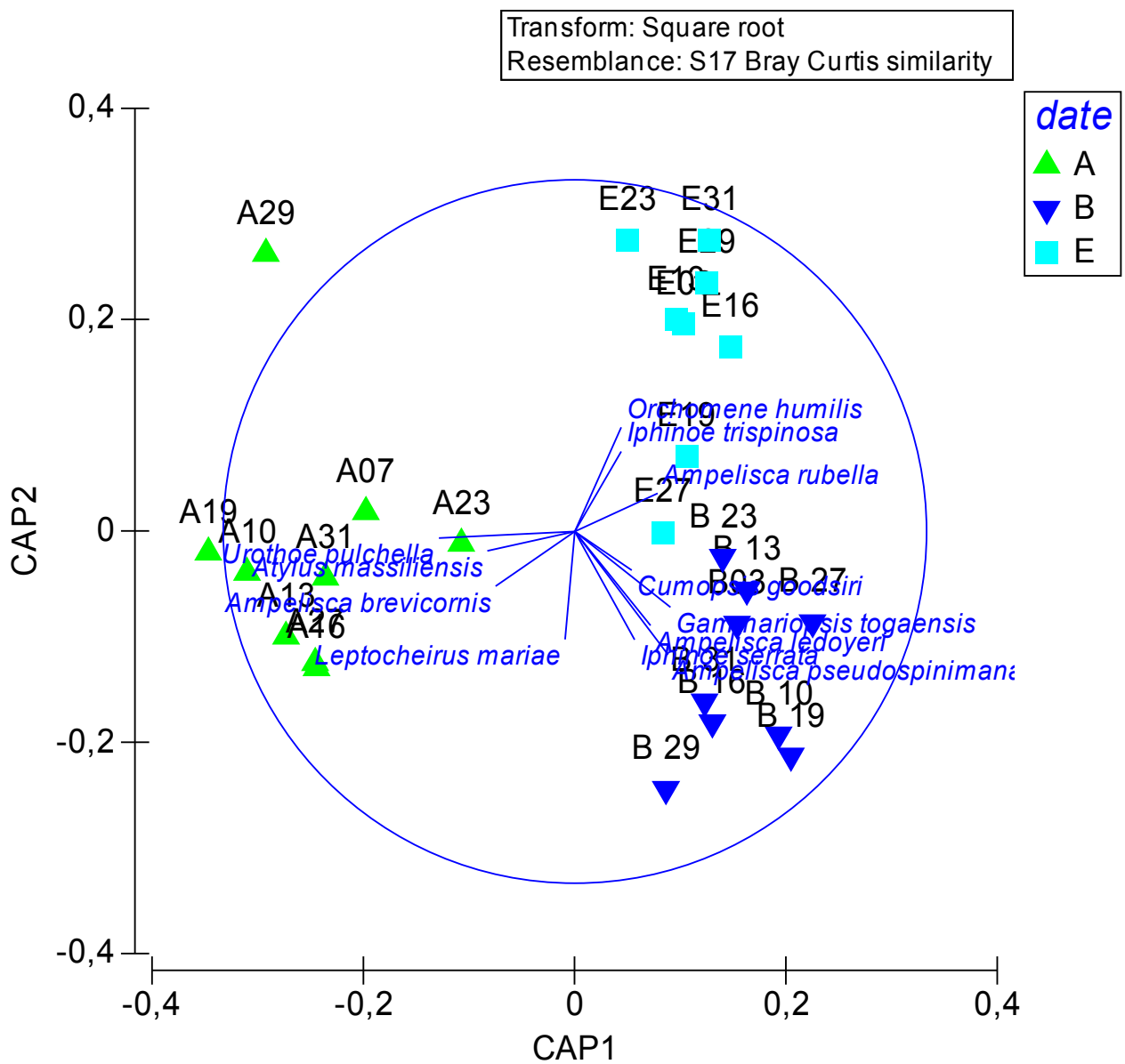


Figura 4.1.2.14 - Analisi Canonica delle Coordinate Principali (CAP) effettuata sui popolamenti delle tre campagne (A, B e E), (autovalori asse 1 0.96 asse 2 0.81).

I risultati dell'analisi statistica multivariata sono mostrati nella figura 4.1.2.15 e 4.1.2.16. La Cluster Analysis così come anche il Plot nMDS, mostrano come non esiste un netto trend di divisione tra le tre campagne; si nota invece come tutte le stazioni appartenenti alle tre campagne poste a profondità superiori a 5 metri siano più simili tra loro, mentre quelle a profondità inferiori mostrano una generale similitudine all'interno della stessa campagna.

Si rammenta che tali analisi sono state effettuate eliminando alcune stazioni (A7, B7, B10, E7, E10) poiché presentano valori molto bassi o nulli delle abbondanze.

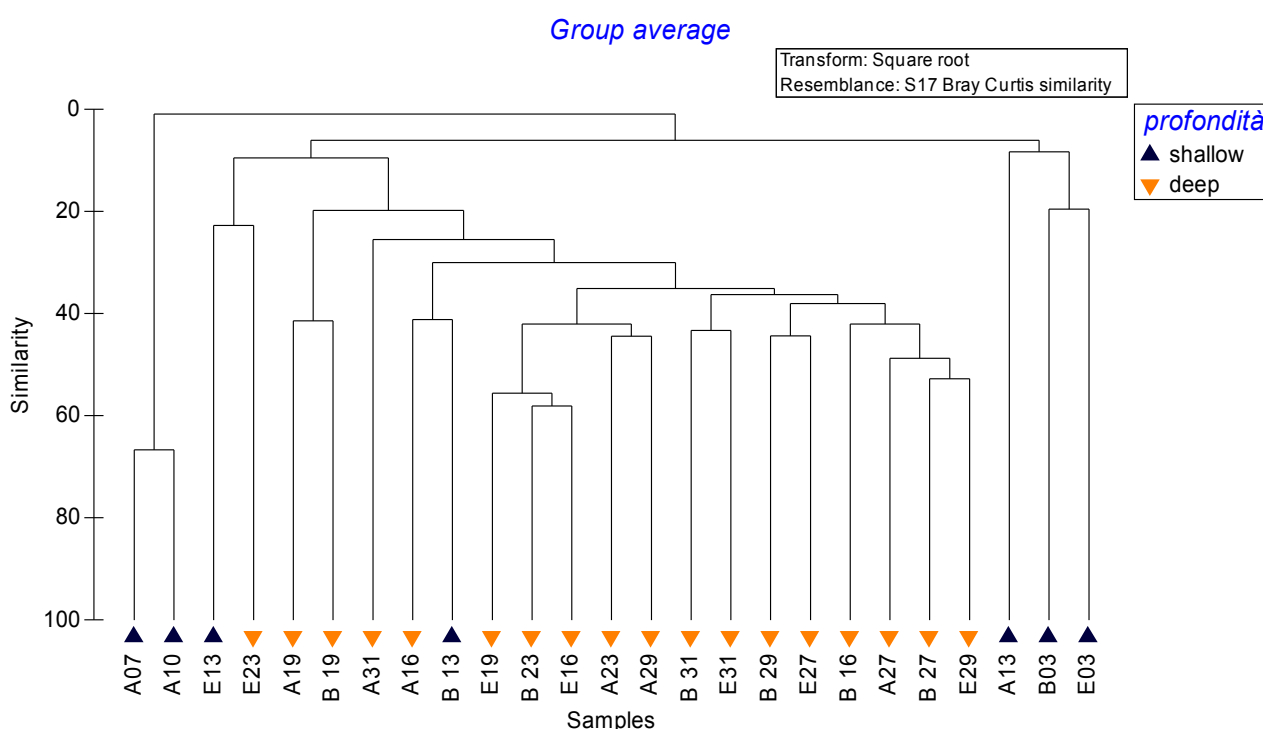


Figura 4.1.2.15 - Cluster Analisi effettuata sulle tre campagne (A, B e E). I triangoli neri identificano le stazioni superficiali (< 5 metri), i triangoli arancioni identificano le stazioni profonde (> 5 metri).

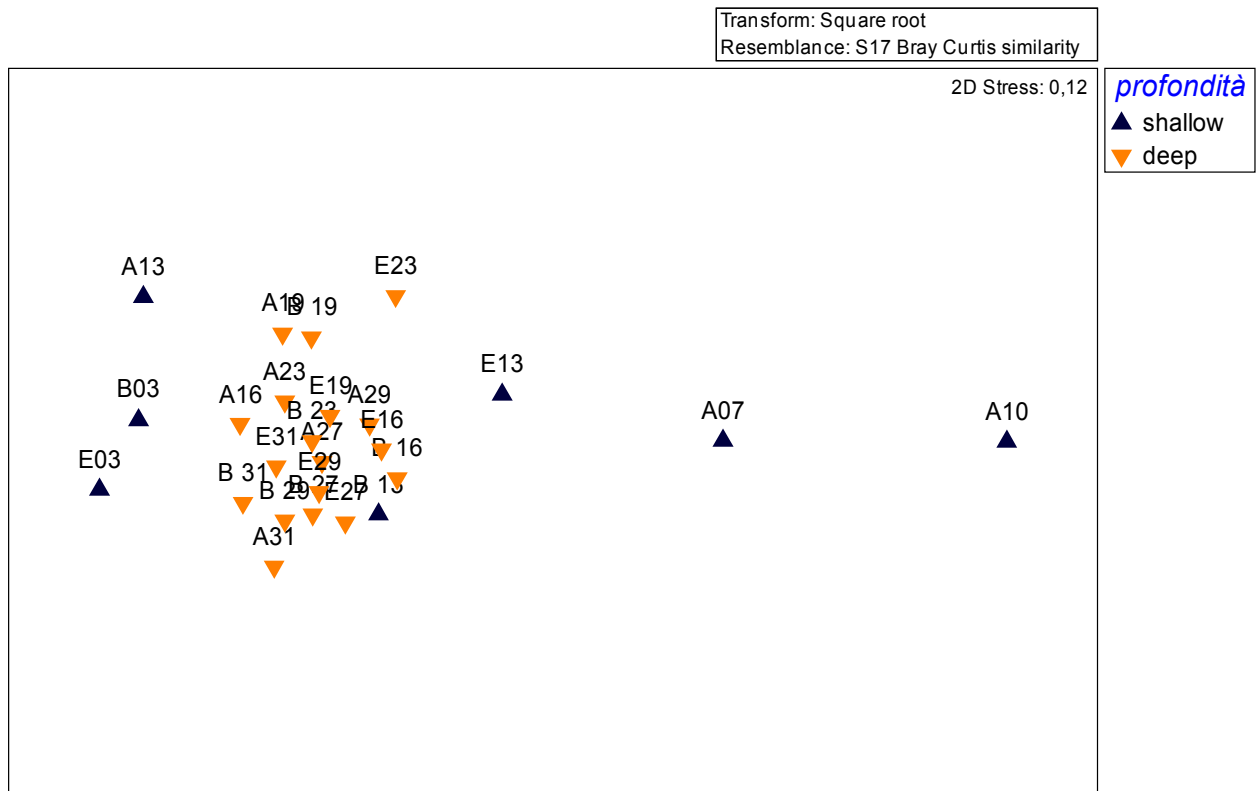


Figura 4.1.2.16 - non Multidimensional Analysis (Stress 0,12) effettuata sulle tre campagne (A, B e E). I triangoli neri identificano le stazioni superficiali (< 5 metri), i triangoli blu identificano le stazioni profonde (> 5 metri).

Dalle analisi effettuate è emerso che la famiglia delle Ampeliscidae è quella che domina i popolamenti in tutte e tre le campagne (A, B e E).

Sono state effettuate analisi quantitative di tutte le specie di *Ampelisca* rinvenute nelle tre campagne.

La figura 4.1.2.17 relativa alla campagna A mostra che questi organismi sono più abbondanti nelle stazioni poste a profondità superiori a 12 metri; si osserva un andamento dei valori di abbondanza piuttosto simili tra tutte e quattro le specie ad eccezione della *Ampelisca sarsi* che mostra un picco nella stazione A19.

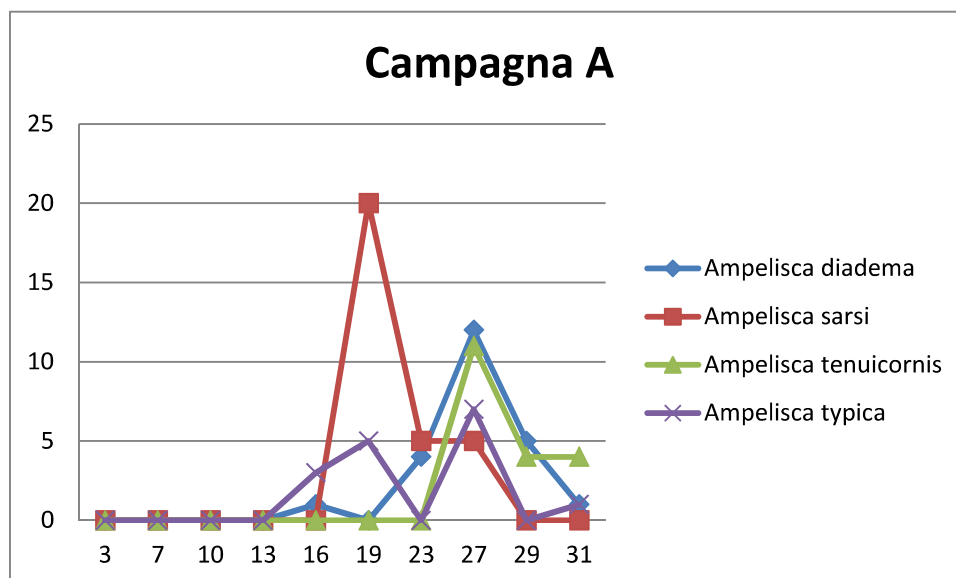


Figura 4.1.2.17 -Valori di Abbondanza osservate per le specie di *Ampelisca* presenti nella Campagna A.

Le specie appartenenti al genere *Ampelisca* ritrovate nella campagna B (Fig. 4.1.2.18) sono innanzitutto un numero superiore rispetto alla precedente campagna (A) e mostrano un andamento estremamente eterogeneo in tutte le stazioni, ad eccezione di quelle sotto i 5 metri in cui presentano un andamento simile.

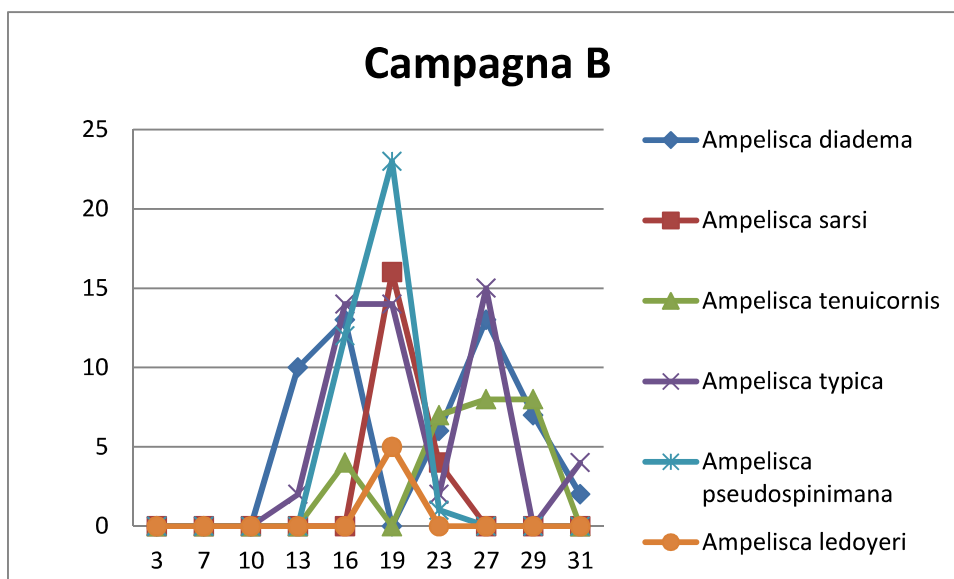


Figura 4.1.2.18 - Valori di Abbondanza osservate per le specie di *Ampelisca* presenti nella Campagna B.

Infine nella campagna E (Fig 4.1.2.19) il numero delle specie tende a diminuire e la distribuzione delle abbondanza nelle varie stazioni mostra valori simili nelle stazioni profonde meno di 5 metri, mentre le altre le specie mostrano un andamento simile, ad eccezione della stazione E19 in cui *Ampelisca sarsi* mostra un picco.

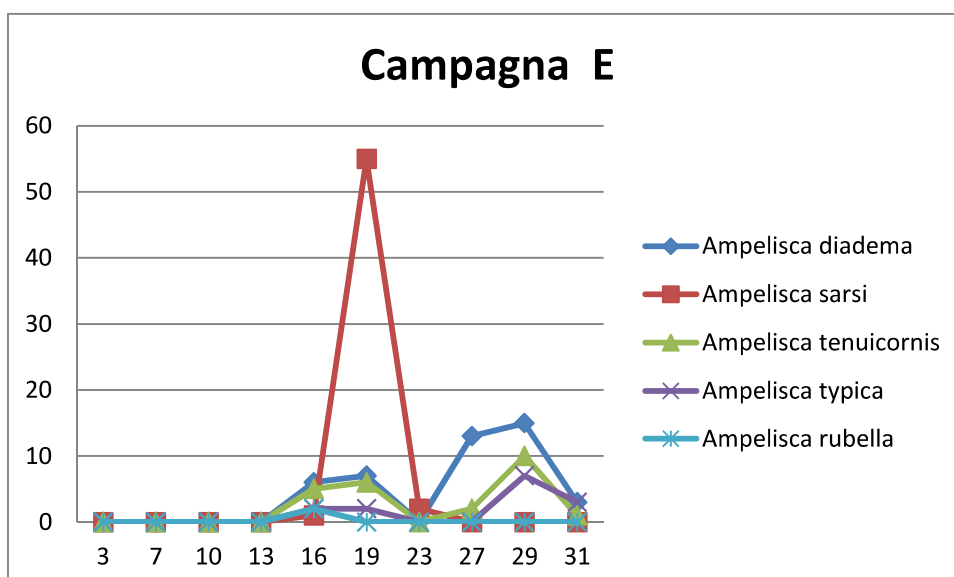


Figura 4.1.2.19 - Valori di Abbondanza osservate per le specie di *Ampelisca* presenti nella Campagna E.

Così come effettuato per l'intera comunità di Peracaridi è stata eseguita l'Analisi statistica multivariata sul popolamento delle sole specie di *Ampelisca* nelle tre campagne.

L'analisi nMDS (Fig 4.1.2.20) mostra una differenza tra le stazioni in base alla profondità, infatti tutte quelle che sono a più di 5 metri sono raggruppate in un unico punto, le altre si dispongono sul piano dell'ordinamento ma non evidenziano differenze tra le campagne.

Per comprendere l'andamento delle stazioni più profonde, è stata effettuata una nuova analisi nMDS, eliminando alcune stazioni (A3, A7, A10, B3, B7, B10, E3, E7, E10, E13). La figura 4.1.2.21 mostra i risultati.

Si nota come le stazioni appartenenti alla stessa campagna non mostrano similitudine maggiore rispetto a quelle appartenenti a campagne diverse, si nota invece come le stazioni poste alle stesse profondità siano disposte più vicine tra loro nel plot rispetto alle altre.

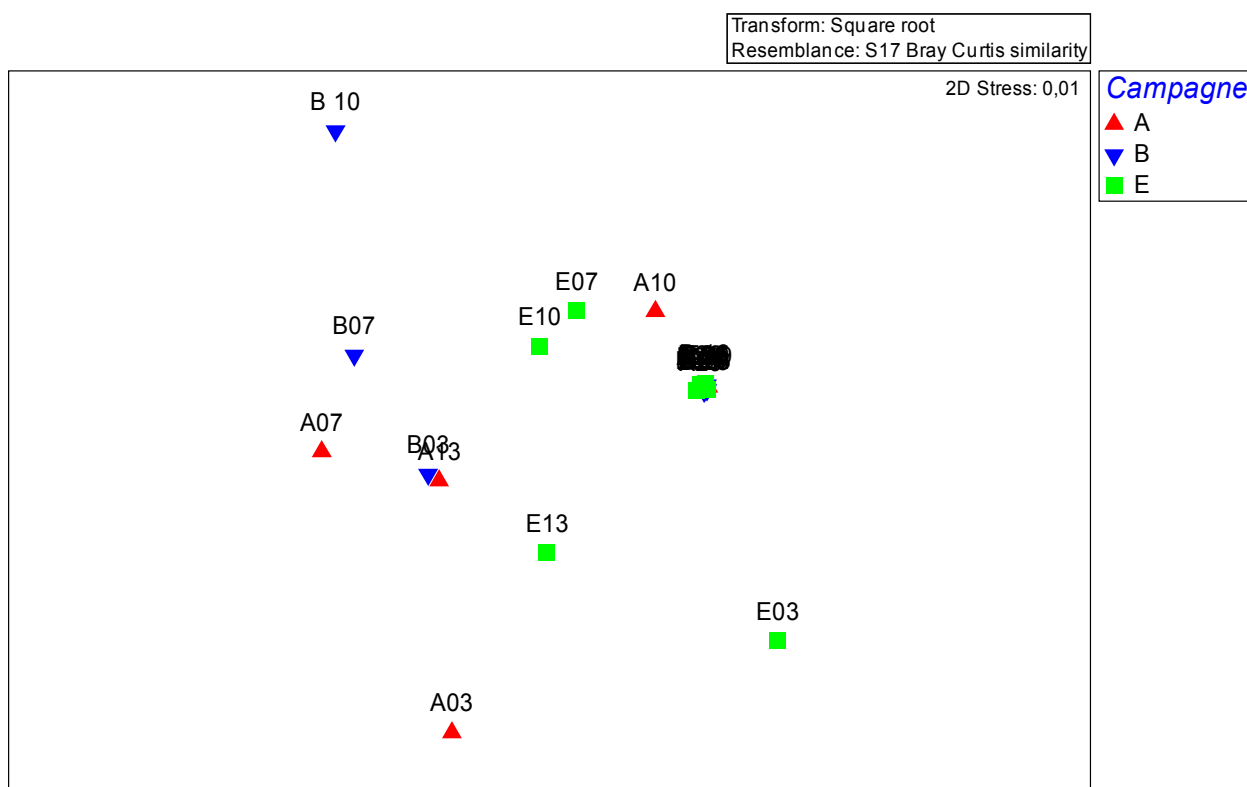


Figura 4.1.2.20 - non Multidimensional Analysis (Stress 0,01) effettuata sulle matrici "specie *Ampelisca* x stazioni" nelle tre campagne (A, B e E).

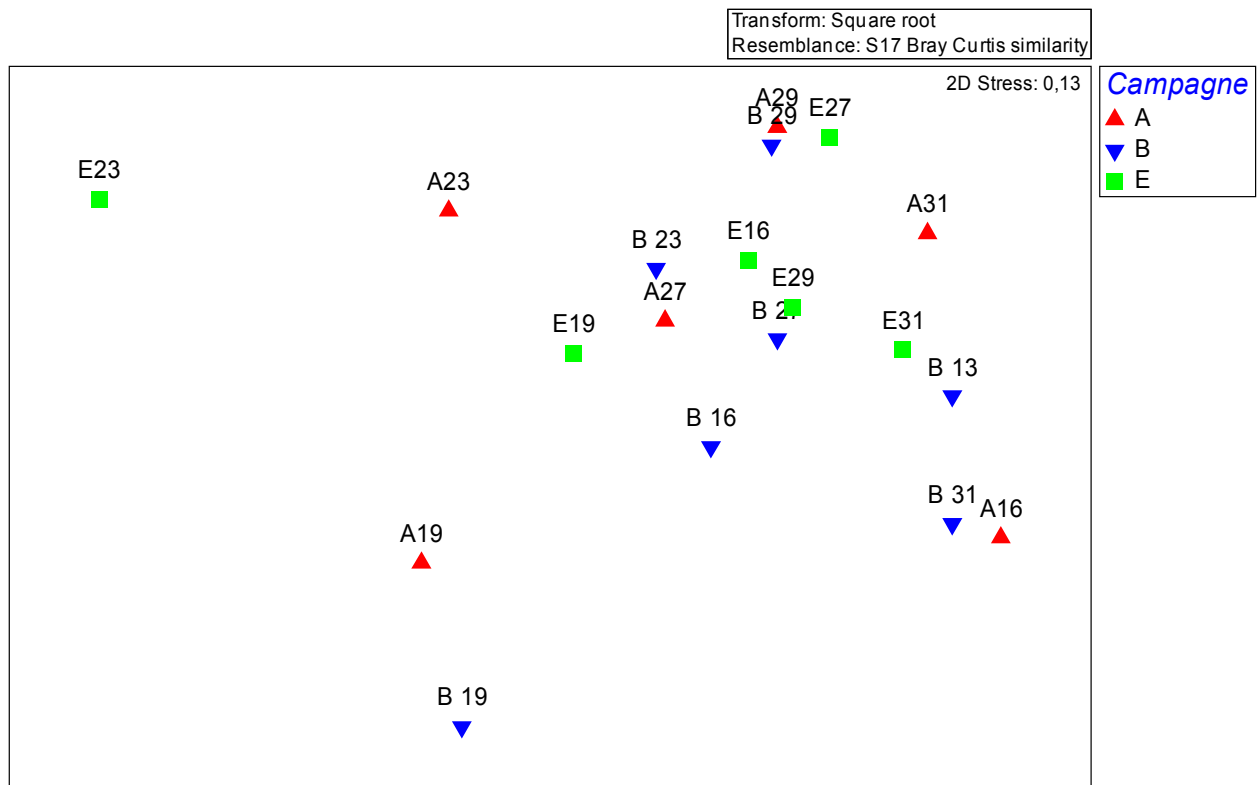


Figura 4.1.2.21 - non Multidimensional Analysis (Stress 0,13) effettuata sulle matrici “specie *Ampelisca* x stazioni” nelle tre campagne (A, B e E) con stazioni eliminate (A3, A7, A10, B3, B7, B10, E3, E7, E10, E13).

4.2 Risultati analisi genetica

In totale sono stati sequenziati 36 individui appartenenti a diverse specie di *Ampelisca* determinate su base morfologica: *A. brevicornis*, *A. typica*, *A. ledoyeri*, *A. diadema* e *A. tenuicornis*.

Le analisi sono state condotte sequenziando un frammento di 525 paia di basi del gene Citocromo Ossidasi I (COI).

SPECIE (morfologica)	n	h	Siti polimorfici	Singoli Siti variabili	Siti informa tivi	%G+ C tot	Hd	Pi (π)	Fu's Fs	Tajima's D
<i>A. brevicornis</i>	6	6	56	38	20	32,2	1,00±0,096	0,040	0,049	-1,01
<i>A. typica</i>	14	13	183	28	155	33,3	0,99±0,001	0,140	0,831	1,26
<i>A. tenuicornis</i>	9	9	157	61	109	33,2	1,00±0,052	0,013	0,406	0,90
<i>A. ledoyeri</i>	5	3	3	3	0	37,1	0,70±0,220	0,002	-0,186	-1,05
<i>A. diadema</i>	2	2	80	48	32	33,5	1,00±0,500	0,152	4,382	n.d.
Overall	36	30	206	18	188	33,7	0,99±0,0001	0,156	0,415	0,44

Tabella VII - Stime di diversità genetica: **n** numero dei campioni sequenziati; **h** numero di aplotipi; **Hd** diversità aplotipica; **Pi (π)** diversità nucleotidica; **Fu's Fs** statistica Fs di Fu; **Tajima's D** statistica di Tajima D.

Le sequenze hanno mostrato 206 siti polimorfici, di cui 188 informativi (Tabella VII).

Complessivamente sono stati osservati 30 diversi aplotipi sulle 36 sequenze ottenute. In questa prima fase della ricerca gli esemplari sono stati classificati esclusivamente su base morfologica, e quindi i raggruppamenti discussi sono quelli risultanti dalla morfologia.

Il numero di aplotipi per specie è risultato essere elevato, variando da 2 aplotipi (per 2 esemplari analizzati) in *A. diadema* a 13 aplotipi su 14 esemplari analizzati in *A. typica* (Tab. VII).

La percentuale di G+C totale oscilla tra il 32,2% (*A. brevicornis*) e il 37,1% (*A. ledoyeri*), questi risultati sono in linea con i valori medi, trovati da Matzen da Silva et al. (2011) in oltre 1572 sequenze di Decapodi.

Il valore della diversità nucleotidica (π) oscilla ampiamente, con valore compresi tra 0,002 per *A. tenuicornis* e 0,152 per *A. diadema*, mentre per gli altri campioni si hanno valori che variano tra 0,040 e 0,0140 (Tab. VII).

Il valore della diversità aplotipica (Hd) va da 0,70 per *A. ledoyeri* a 1,00 per *A. brevicornis*, *A. tenuicornis* e *A. diadema*.

I valori di F_{ST} ottenuti per i campioni di *Ampelisca* suddiviso come morfospecie hanno un intervallo che varia da 0.129 a 0.886. Il valore più alto è stato riscontrato tra i campioni di *A. brevicornis* e *A. ledoyeri*. I vari confronti a coppie effettuati risultano statisticamente significativi, e quindi indicativi di eterogeneità genetica, tra tutte le specie, ad eccezione di *A. diadema* che mostra valori non significativi a causa del basso numero di individui analizzati (Tab. VIII).

	<i>A. typica</i>	<i>A. ledoyeri</i>	<i>A. tenuicornis</i>	<i>A. diadema</i>	<i>A. brevicornis</i>
<i>A. typica</i>	-----				
<i>A. ledoyeri</i>	0.472 **	-----			
<i>A. tenuicornis</i>	0.129**	0.308**	-----		
<i>A. diadema</i>	0.141ns	0.472ns	0.313ns	-----	
<i>A. brevicornis</i>	0.474***	0.886***	0.532***	0.679**	-----

Tabella VIII. Valori di F_{ST} calcolati per ciascuna coppia delle morfospecie analizzate.

* $P < 0.05$;

** $0.05 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = non significativo

I valori di distanza genetica sono stati calcolati, secondo il metodo di Kimura 2 parametri (1993), sia tra gli individui all'interno delle specie sia tra le specie. Come si può osservare i valori più alti corrispondono al confronto tra *A. brevicornis* e le altre specie, i valori più bassi si osservano tra *A. diadema* e *A. ledoyeri* (0,09) e tra *A. diadema* e *A. tenuicornis* (0,11), valori relativamente affidabili a causa del basso numero di individui della prima specie.

	<i>A. diadema</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. tenuicornis</i>	<i>A. ledoyeri</i>	<i>A. brevicoris</i>
<i>A. diadema</i>		0,02	0,01	0,01	0,02
<i>A. typica</i>	0,19		0,01	0,02	0,02
<i>A. tenuicornis</i>	0,11	0,17		0,01	0,02
<i>A. ledoyeri</i>	0,09	0,21	0,13		0,02
<i>A. brevicoris</i>	0,23	0,23	0,23	0,24	

Tabella IX - Valori di distanza genetica di Kimura 2 parametri (1993) tra le morfospecie di *Ampelisca* studiate (al di sotto della diagonale). L'errore standard (al di sopra della diagonale) è stato calcolato utilizzando il "bootstrapping" con 1000 pseudorepliche.

L'AMOVA è stata eseguita considerando: 1) la varianza tra gli individui all'interno delle popolazioni; 2) la varianza tra popolazioni. La percentuale maggiore di variazione è risultata risiedere prevalentemente a livello intraspecifico, con valori percentuali pari al 60%, mentre tra le popolazioni i valori si aggirano intorno al 40%. Questo dato indica un'eterogeneità all'interno dei gruppi (specie morfologiche) analizzati maggiore di quella rilevata tra i gruppi.

Fonte di variabilità	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
Tra morfospecie	583.148	17.89241	39.64
All'interno delle morfospecie	844.741	27.24972	60.36
Totale	1427.889	45.14212	

Tabella X - Struttura delle popolazioni analizzata con l'analisi della varianza molecolare (AMOVA).

Per raffigurare il grado di affinità genetica tra le specie analizzate è stato costruito un Neighbour Joining basato sulle distanze genetiche calcolate secondo il metodo kimura 2 parametri, utilizzando come outgroup la sequenza del crostaceo *Scylla olivacea* (GenBank accession number: JQ062904.1) dello stesso frammento qui analizzato.

Come si può osservare in Figura 4.2.1 è possibile distinguere 4 raggruppamenti con valori di bootstrap compresi tra 40 e 100. Nel cluster (1) rientrano prevalentemente esemplari morfologicamente classificati come *A. typica*, assieme ad altri due identificati come *A. tenuicornis*. In questo raggruppamento i campioni del Mar Tirreno tendono a clusterizzare assieme, con l'eccezione dell'esemplare TY1, che va ad inserirsi tra i campioni adriatici. Questo cluster ha un valore di bootstrap del 56% per tutti i campioni sia adriatici che tirrenici, mentre per i raggruppamenti specifici si osserva il 99-100%. Il cluster (2) comprende gli esemplari tirrenici di *A. ledoyeri* ed *A. tenuicornis* (oltre a due esemplari assegnati morfologicamente ad *A. typica* e *A. diadema*, rispettivamente), tutti molto simili tra di loro geneticamente; il valore di bootstrap corrisponde al 41%. Il cluster (3) raggruppa tutti gli esemplari di *A. tenuicornis* del mar Adriatico (oltre a tre esemplari assegnati morfologicamente ad *A. typica* (2) e *A. diadema*, rispettivamente); anche questo cluster, come il precedente ha un bootstrap del 40%. Nell'ultimo cluster (4) troviamo tutti gli esemplari di *A. brevicornis* (provenienza Mar Tirreno), in questo caso il bootstrap è pari al 62%.

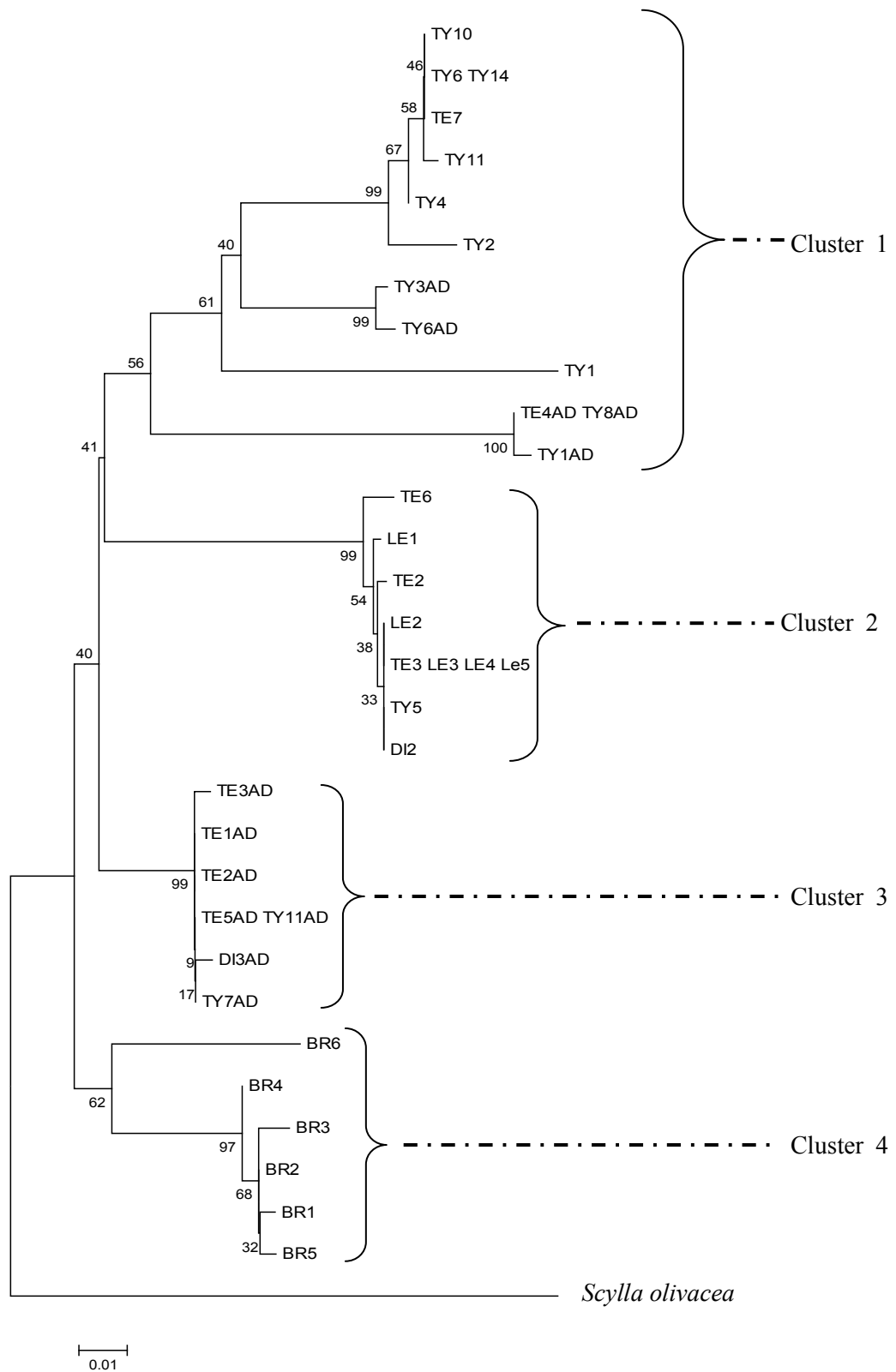


Figura 4.2.1 - Dendrogramma Neighbour Joining basato sulla distanza K2P, utilizzando come outgroup il crostaceo Decapode *Scylla olivacea*.

Osservando il dendrogramma Neighbour Joining di Fig4.2.1, è possibile rilevare delle discrepanze tra l'attribuzione morfologica e la clusterizzazione su base genetica. Infatti i 4 cluster che compongono il NJ raggruppano esemplari geneticamente affini, che però sono stati spesso attribuiti a specie diverse.

Per comprendere se ci sono stati casi di errata attribuzione, a causa di caratteri morfologici di difficile interpretazione e/o l'attuale suddivisione a livello specifico del genere *Ampelisca* necessiti di una revisione, si è deciso di rielaborare i dati raccolti basandoci sui quattro gruppi evidenziati dal NJ.

I cluster indicati in Fig. 4.2.1 comprendono:

- **Cluster 1:** 11 esemplari di *A. typica* (di cui 4 del Mar Adriatico), 2 *A.tenuicornis* (di cui 1 del Mar Adriatico)
- **Cluster 2:** 3 *A. tenuicornis*, 5 *A. ledoyeri*, 1 *A. diadema*, 1 *A. typica*
- **Cluster 3:** 4 *A. tenuicornis*, 2 *A. typica*, 1 *A.diadema* (tutti campioni del Mar Adriatico)
- **Cluster 4:** solo esemplari di *A. brevicornis* (6)

Rielaborando i dati sulla base dei quattro gruppi suddetti si ottiene che la Diversità Nucleotidica (π) varia da valori molto piccoli 0,005 per il Cluster 2, a valori più elevati 0,116 per il Cluster 1. Il valore della Diversità Aplotipica (H_d) è compresa tra 0,87 (Cluster 2) e 1,00 (Cluster 4) (Tab. XI).

SPECIE	n	Siti polimorfici	Singoli Siti variabili	Siti informativi	h	%G+C tot	Hd	Pi (π)	Fu's Fs	Tajima's D
Cluster 1	13	158	59	69	11	33,3	0,98 $\pm$ 0,054	0,116	2,271	1,29
Cluster 2	10	12	11	1	7	37,1	0,87 $\pm$ 0,107	0,005	-2,338	-1,63
Cluster 3	7	11	11	0	6	29,9	0,95 $\pm$ 0,095	0,006	-2,128	-1,62
Cluster 4	6	56	38	20	6	32,2	1,00 $\pm$ 0,096	0,040	0,049	-1,01
Tot	36	206	18	188	30	33,7	0,99 $\pm$ 0,0001	0,156	0,415	0,44

Tabella XI - Stime di diversità genetica: n numero dei campioni; h numero degli aplotipi; Hd diversità aplotipica; Pi (π) diversità nucleotidica; Fu's Fs statistica Fs di Fu; Tajima's D statistica di Tajima D.

I valori di F_{ST} ottenuti dal confronto dei Cluster hanno un intervallo che varia da 0,553 a 0,963; il valore più alto è stato riscontrato tra il Cluster 2 e il Cluster 3 (0,963) il più basso tra i Cluster 1 -4. Tutti i valori osservati sono significativi ($P < 0,001$) (Tab. XII).

	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Cluster 1	-----			
Cluster 2	0,88774***	-----		
Cluster 3	0,91183***	0,96321***	-----	
Cluster 4	0,55369***	0,59444***	0,66359***	-----

Tabella XII - Valori di F_{ST} calcolati per ciascuna coppia dei cluster analizzati. * $P < 0,05$; * $0,05 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$

I valori di distanza genetica sono stati calcolati, secondo il metodo di Kimura 2 Parametri tra i Cluster individuati. Come si può osservare i valori risultano pressoché equiparabili, compresi tra 0,21 (tra Cluster1-2 e 2-4) e 0,24 (Cluster 3-4). Il valore più basso si osserva tra il Cluster 1 e il 3 (0,17).(Tab. XIII)

	Cluster1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Cluster 1	-----	0,02	0,02	0,02
Cluster 2	0,21	-----	0,02	0,02
Cluster 3	0,17	0,23	-----	0,02
Cluster 4	0,22	0,21	0,24	-----

Tabella XIII - Valori di distanza genetica di Kimura 2 parametri (1993) tra individui all'interno dei cluster (al di sotto della diagonale). L'errore standard (al di sopra della diagonale) è stato calcolato utilizzando "bootstrapping" con 1000 pseudorepliche

L'AMOVA effettuata su base genetica è stata eseguita considerando: la varianza tra gli individui all'interno delle popolazioni e la varianza tra popolazioni. Rispetto ai risultati ottenuti raggruppando gli individui su base morfologica, la distribuzione della varianza tra i gruppi è pari a 72,56% (prima era solo il 40%) mentre all'interno delle popolazioni è distribuito il 27,44% (contro il 60% del precedente raggruppamento). Quindi la variabilità è distribuita essenzialmente tra le specie e non all'interno di esse (Tab. XIV).

Fonte di variabilità	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
Tra specie	989.363	36.23889	72.56
All'interno delle specie	438.526	13.70394	27.44
Totale	1427.889	49.94283	

Tabella XIV - Struttura delle popolazioni analizzata con l'analisi della varianza molecolare (AMOVA).

Quindi in base a quanto osservato possiamo denominare i quattro cluster come segue:

- **Cluster 1:** *A. typica* (Mar Tirreno e Mar Adriatico);
- **Cluster 2:** *A. tenuicornis* + *A. ledoyeri* (Mar Tirreno);
- **Cluster 3:** *A. tenuicornis* (Mar Adriatico)
- **Cluster 4:** *A. brevicornis* (Mar Tirreno)

5.DISCUSSIONI

5.1 Discussioni dati ecologici

Le modificazioni dei fattori ambientali, sia di origine antropica che naturale, possono determinare variazioni quantitative e qualitative nella struttura delle comunità bentoniche.

Le analisi effettuate sulla comunità di Peracaridi mostrano che le attività di posa della condotta *offshore* hanno generato alcune modificazioni, seppur lievi, sui popolamenti esaminati; si possono invece ritenere trascurabili i possibili effetti delle variazioni stagionali su tali comunità, in quanto i periodi in cui sono stati raccolti i campioni sono del tutto confrontabili.

Da un punto di vista temporale si osservano dei cambiamenti nella struttura della comunità durante le tre campagne, tali differenze sono risultate statisticamente significative (Pairwise Test Tab III) sia tra le campagne A (di bianco) e B (di cantiere) (0,0026) che tra le campagne A ed E (di esercizio) (0,0052), ma non tra le campagne B ed E; ciò è dovuto al fatto che il popolamento ha subito delle variazioni in seguito all'escavo per la posa della condotta, ma successivamente ha recuperato la sua struttura originaria, e conseguentemente i popolamenti delle campagne B ed E sono tra loro più simili.

Le attività di posa hanno generato sostanzialmente un'alterazione della componente granulometrica, con un aumento della frazione granulometrica più fine (argilla), a discapito di quella più grossolana (sabbia), durante la campagna B (di cantiere), e perdura anche nella campagna E (di esercizio).

Inoltre le analisi BIOENV (Tab V) hanno evidenziato che il popolamento osservato durante la campagna B è fortemente influenzato sia dalla presenza di argilla che dalla sostanza organica; quest'ultima può comparire nel sedimento in seguito alla movimentazione, sia per risospensione sia generata in seguito alla morte e decomposizione degli organismi bentonici.

Poiché le caratteristiche del sedimento sono considerate un "super parametro" per gli organismi del benthos (Fresi *et al.*, 1983) le loro modificazioni si rispecchiano sulla struttura dei popolamenti bentonici, anche nel nostro caso le specie e le loro abbondanze hanno subito alcune modificazioni.

Discutendo dunque la struttura del popolamento e l'ecologia delle diverse specie di Peracaridi che lo compongono, comparando/alternandosi/affiancandosi durante le 3 campagne analizzate, si può osservare, iniziando dalla prima campagna, **la campagna A di bianco** (Tab. X), che il popolamento è caratterizzato, nelle stazioni poste al di sotto dei 5 metri, da specie legate a sedimenti sabbiosi (la grana della sabbia è fine secondo le classi granulometriche Wentworth): gli anfipodi *Ampelisca*

brevicornis e *Urothoe pulchella*, specie caratteristiche della biocenosi delle Sabbie Fini Ben Calibrate (SFBC), *sensu* Peres&Picard, 1964, e il tanaidaceo *Apseudopsis latreillii*.

In particolare *Urothoe pulchella* è una specie sabulicola in grado di vivere in un ambiente ad elevata energia idrodinamica, monotono e poco strutturato; si tratta di una specie sospensivora, che dunque non necessita della costruzioni di tubi (Scipione 1989). Questa specie è stata rinvenuta solo in questa campagna e la sua scomparsa è probabilmente dovuta alla risospensione della frazione più fine del sedimento.

Il tanaidaceo *Apseudopsis latreillii* è una specie legata alla componente sabbiosa, che alcuni autori hanno descritto capace di tollerare il disturbo (Borja et al., 2000; Marín-Guirao et al., 2005; Simboura and Reizopoulou, 2007), altri come una specie sensibile (J. A. de-la-Ossa-Carretero 2010). Nel nostro caso si osserva un aumento degli individui nella campagna B di cantiere in una sola stazione, in cui si registra uno dei valori percentuali più bassi della materia organica .

Spostandosi nelle stazioni poste a maggiori profondità (dai 5 ai 28,5 metri), sempre durante la campagna A, si è osservato un sedimento misto, ovvero caratterizzato sia una importante componente fangosa (limo e argilla), che da quella sabbiosa (con grana fine classi granulometriche Wentworth); qui si trovano, infatti, specie legate a sedimenti fangosi come gli anfipodi *Ampelisca diadema*, *Ampelisca tenuicornis* e *Ampelisca typica*, riportate in letteratura come specie limicole tolleranti, tipiche di sedimenti detritici costieri (DC) o Detritici infangati (DE) (Peres&Picard, 1964); specie sabulicole tolleranti, come *Ampelisca sarsi*, la quale vive sia su substrati con sabbia fine, che fangosi. Le specie appartenenti al genere *Ampelisca* sono presenti in tutte le campagne; probabilmente questa loro capacità è dovuta al tipo di trofismo, sono infatti specie Detritivore–Sospensivore ossia possono alimentarsi raccogliendo il detrito sul fondo tramite le antenne o filtrando il materiale organico in sospensione sempre utilizzando le antenne, in base alle condizioni del substrato (Scipione 1989).

Altre specie rinvenute in questa campagna sono gli anfipodi *Atylus massiliensis*, *Leucothoe serraticarpa*, *Perioculodes longimanus longimanus*, *Westwoodilla rectirostris*, e l'isopode *Eurydice affinis*, specie caratteristica di fondi mobili (Peres&Picard, 1964).

Tabella X - Lista delle specie di Peracaridi presenti nelle tre campagne (A, B ed E) e relativa ecologia.

Specie	Campagna A	Campagna B	Campagna E	Ecologia
<i>Ampelisca brevicornis</i>	X	x		SFBC
<i>Ampelisca diadema</i>	X	x	x	DE
<i>Ampelisca ind.</i>	X		x	
<i>Ampelisca ledoyeri</i>		x		DE
<i>Ampelisca pseudospinimana</i>		x		DE
<i>Ampelisca rubella</i>		x	x	Roccia e Alghe
<i>Ampelisca sarsi</i>	X	x	x	Sabbia fine e Fango
<i>Ampelisca tenuicornis</i>	X	x	x	DC
<i>Ampelisca typica</i>	X	x	x	DE
<i>Anthura gracilis</i>			x	-
<i>Apseudopsis latreillii</i>	X	x	x	Sabulicolo
<i>Atylus guttatus</i>			x	Sabulicolo
<i>Atylus massiliensis</i>	X			Sabulicolo
<i>Autonoe spiniventris</i>		x	x	Sabulicolo
<i>Bathyporeia guilliansoniana</i>		x		SFBC
<i>Bodotria scorpioides</i>		x		SFBC
<i>Cirolana cranchii</i>		x		-
<i>Cumopsis goodsiri</i>		x		Sabbia fangosa
<i>Cymonoe truncata</i>			x	Fondi duri
<i>Diastylis ind.</i>	X			
<i>Diastylis neapolitana</i>	X	x	x	-
<i>Diastylis rugosa</i>	X			-
<i>Erichthonius brasiliensis</i>	X			Limicolo
<i>Eudorella ind.</i>			x	
<i>Eurydice affinis</i>	X	x	x	Sabulicolo
<i>Gammaropsis togoensis</i>		x	x	Fondi mobili
<i>Harpinia dellavallei</i>	X	x		Limicolo
<i>Iphinoe serrata</i>	X	x	x	DE
<i>Iphinoe tenella</i>	X	x	x	Limicolo
<i>Iphinoe trispinosa</i>		x	x	SFBC
<i>Leptocheirus mariae</i>	X	x		Limicolo
<i>Leptocheirus pectinatus</i>	X			Alghe e Sabbia
<i>Leptocheirus sp.</i>	X			
<i>Leucothoe oboa</i>	X			Limicolo

<i>Leucothoe serraticarpa</i>	X	x	x	Sabulicolo
<i>Medicorophium rotundirostre</i>		x		Limicolo
<i>Medicorophium runcicorne</i>	X	x	x	Limicolo
<i>Megaloropus massiliensis</i>		x		Sabulicolo
<i>Monoculodes acutipes</i>		x		Fangofilo
<i>Monoculodes gibbosus</i>		x		Fangofilo
<i>Monoculodes griseus</i>	X	x	x	Fangofilo
<i>Orchomene humilis</i>			x	Alghe e Spugne
<i>Paraphoxus oculatus</i>		x		Fangofilo
<i>Periiculodes longimanus</i> <i>longimanus</i>	X	x	x	SFBC
<i>Photis longicaudata</i>	X	x	x	Fangofilo
<i>Phtsica marina</i>		x	x	LRE
<i>Urothoe pulchella</i>	X			SFBC
<i>Westwoodilla rectirostris</i>	X	x		Sabulicolo

Nella campagna B di cantiere si osservano, rispetto alla campagna precedente, alcune modifiche del popolamento, prevalentemente in termini di numero di individui ed in misura molto minore di specie.

Le variazioni delle frazioni granulometriche riguardano un po' tutte le stazioni, sia come valori percentuali che come grana della sabbia, in particolare le stazioni sotto i 5 metri mostrano una grana della sabbia che passa da fine a finissima (classi granulometriche Wentworth), ed un aumento della frazione granulometrica più sottile.

Quindi, nelle stazioni sotto i 5 metri la presenza della componente granulometrica più fine determina la comparsa di specie legate a questo tipo di substrato, come *Ampelisca diadema*, *Ampelisca typica*, presenti anche nelle stazioni più profonde.

Sono state rinvenute anche elementi faunistici legati alla frazione sabbiosa, come *Bathyporeia guilliamsoniana* (SFBC, Peres&Picar, 1964); quest'ultima è legata ad un tipo di sedimento instabile ed appartiene alla categoria etologica degli scavatori liberi endopsammici (Marques e Bellan-Santini, 1993).

Anche nelle stazioni più profonde si assiste alla comparsa di specie legate a sedimenti sabbiosi come *Autonoe spiniventris*, il cumaceo *Bodotria scorpioides*, caratteristico della Biocenosi delle Sabbie Fini Ben calibrate (SFBC); gli anfipodi *Megaloropus massiliensis* e *Phtisica marina*, specie a Larga Ripartizione Ecologica (LRE) (Peres&Picard, 1964). Sono state inoltre rinvenuti gli anfipodi *Ampelisca sarsi*, *Ampelisca tenuicornis*, *Medicorophium runcicorne*, *Leucothoe serraticarpa*, *Periocolodes longimanus longimanus*, il tanaidaceo *Apseudopsis latreilli* e il cumaceo *Iphinoe serrata*.

Infine, **nella campagna E di esercizio**, la sabbia, che è a grana *finissima* (classi granulometriche secondo Wentworth), persiste nelle stazioni a meno di 5 metri, mentre in quelle più profonde si nota un decremento della componente fine, avvicinandosi ai valori osservati in A.

E' stato rinvenuto l'isopode *Cymodoce truncata*, specie che vive su fondi duri, e l'anfipode *Orchomene humilis*, che vive su alghe e spugne; inoltre sono presenti gli anfipodi *Ampelisca rubella*, *Ampelisca diadema*, *Ampelisca sarsi*, *Ampelisca tenuicornis*, *Ampelisca typica*, *Medicorophium runcicorne*, *Leucothoe serraticarpa*, *Periocolodes longimanus longimanus*, *Autonoe spiniventris*, *Gammaropsis togoensis*, *Phtisica marina* ed i cumacei *Iphinoe strispinosa* e *Iphinoe serrata* il tanaidaceo *Apseudopsis latreilli*.

In generale si osserva nella campagna A un popolamento con specie legate alla sabbia presenti soprattutto nelle stazioni sotto i 5 metri, secondo la bibliografia (Vatova 1949, Peres&Picard, 1964), dovremmo trovarci nella biocenosi delle Sabbie Fini degli alti Livelli (SFHN) e delle sabbie Fini Ben Calibrate (SFBC); procedendo verso il largo, si passa ad un popolamento formato sia da specie sabulicole che fangose, biocenosi del Misto (stazione 16), per poi passare alla biocenosi dei Fanghi Terrigeni Costieri (VTC) e del Detritico Costiero (DC) (dalla stazione 19 alla 31), in cui sono presenti prevalentemente specie legate appunto al fango (Peres&Picard, 1964).

Questa situazione si altera durante la campagna B, in cui aumenta la componente fine del sedimento in tutte le stazioni, facendo anche aumentare l'area di distribuzione di alcune specie legate al fango, che troviamo in stazioni in cui prima non erano presenti, come ad esempio le specie *Ampelisca typica* e *Ampelisca diadema* che troviamo fino ai 5 metri.

Infine nella campagna E le condizioni ambientali mostrano un ritorno alla condizione “naturale” con il parziale recupero della componente sabbiosa e la scomparsa delle specie fangofile dalle stazioni meno profonde.

Queste osservazioni ci indicano che le specie che ritroviamo dopo l'evento di perturbazione (campagna B), generato dalla posa della condotta, hanno una buona capacità di adattamento a variazioni granulometriche di bassa entità.

Le differenze osservate su base ecologica tra i popolamenti dei peracaridi nelle tre campagne, appaiono poco nette nell'analisi nMDS, infatti sul plot le stazioni si raggruppano in base al fattore batimetrico piuttosto che in base alla campagna, tuttavia il test della PERMANOVA come già detto precedentemente, conferma quanto emerge dall'analisi ecologica del popolamento: le differenze tra le campagne sono risultate statisticamente significative.

La comunità dei Peracaridi ha dimostrato di avere la capacità di descrivere gli effetti prodotti dalla perturbazione provocata dalla posa di una condotta *offshore*; la coerenza della sua risposta può essere ulteriormente valutata confrontandola con l'analisi nMDS effettuata sulla comunità macrozoobentonica (Fig. 5.1.1) (ISPRA Relazione tecnico scientifica 2E Febbraio 2012).

Il *plot* ottenuto analizzando l'intero popolamento mostra solo una più netta divisione delle stazioni rispetto a quello visualizzato per il popolamento a Peracaridi: in entrambi la maggior parte delle stazioni poste a profondità maggiore di 5 metri (*deep*) si raggruppa, così come quelle poste a profondità minori (< 5 metri; *shallow*).

Nei due grafici sottostanti, quindi, non si evincono sostanziali differenze tra le tre campagne osservate.



Figura 5.1.1 - Analisi nMDS sull'intero popolamento bentonico (a) e popolamento dei Peracaridi (b).

E' stato osservato che le specie appartenenti al genere *Ampelisca* dominano il popolamento in tutte e tre le campagne, si è voluto dunque valutare se tale taxon fosse in grado di descrivere gli effetti prodotti dalla posa della condotta *offshore* al pari dell'intero popolamento a Peracaridi.

Il genere *Ampelisca* è riconosciuto come indicatore ambientale soprattutto per eventi di arricchimento organico ed alterazioni della composizione chimica del sedimento (e.g. Gesteira Gomez, et al. 2000, N'siala Massamba et al 2008).

Per quanto riguarda la famiglia Ampeliscidae, le analisi hanno mostrato che nella **campagna A** i taxa più abbondanti sono *Ampelisca sarsi*, *Ampelisca* ind., *Ampelisca didema*, e *Ampelisca tenuicornis*. La movimentazione del fondo, durante la **campagna di cantiere B**, ha determinato l'aumento di *Ampelisca typica*, probabilmente dovuto all'affinità di questa specie con le frazioni più fini del sedimento, e appartenente alla biocenosi del Detritico Infangato (DE; Peres&picard, 1964); contemporaneamente la diminuzione di *Ampelisca sarsi*, la quale invece è una specie che nel nostro caso predilige sabbie fini; infine, una lieve diminuzione di *Ampelisca tenuicornis*, che alcuni Autori riportano come specie sensibile all'inquinamento (Poggiale et al 2001). In ultimo, nella **campagna E**, *Ampelisca sarsi* ritorna ad essere la specie dominante, seguita da *Ampelisca diadema* e *Ampelisca tenuicornis*, a dimostrazione del fatto che verosimilmente i cambiamenti che il sedimento ha subito sono stati di lieve entità e di natura transitoria.

In letteratura (Massamba N'Siala et al. 2008), *Ampelisca diadema* è riportata come specie bioindicatrice di recupero ambientale, sensibile alle perturbazioni; la sua abbondante presenza nelle campagna E può stare quindi ad indicare che il popolamento è in fase di recupero dopo la perturbazione.

L'analisi statistica condotta sul popolamento delle specie di *Ampelisca* non mostra differenze tra le campagne, piuttosto emergono differenze tra le diverse batimetrie in maniera più netta come si può osservare nei grafici di figura 4.1.2.20 e 4.1.2.21.

Tali risultati riproducono quelli precedentemente mostrati (Fig. 5.1.1) sia per il popolamento dei Peracaridi che per l'intera comunità bentonica.

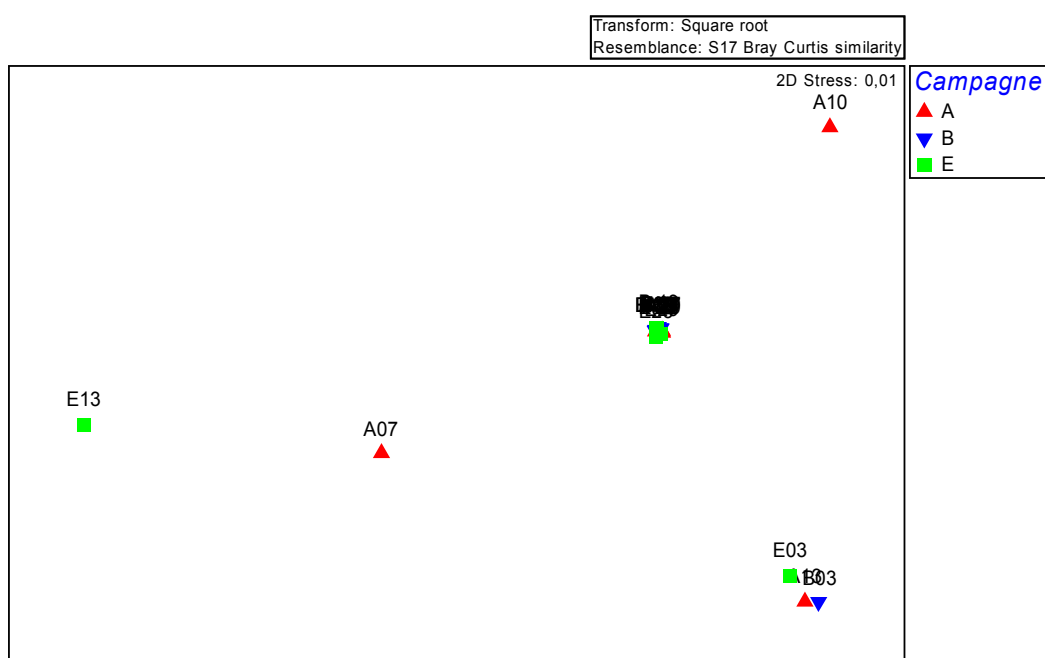


Figura 4.1.2.20 Analisi nMDS condotto sul popolamenti ad *Ampelisca* su tutte le stazioni.

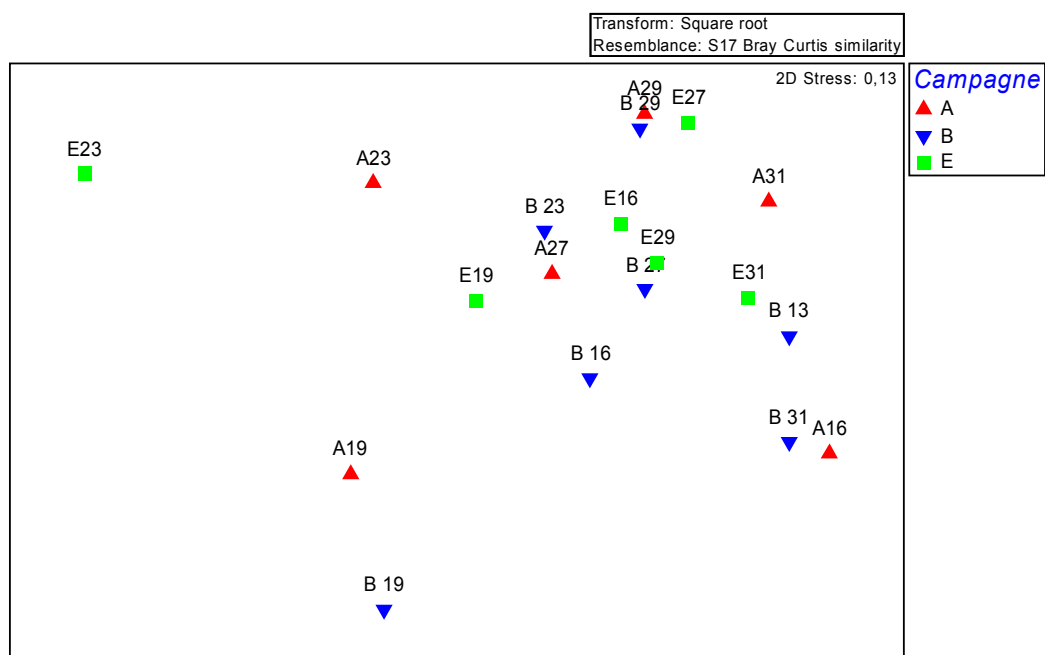


Figura 4.1.2.21 - Analisi nMDS condotto sul popolamenti ad *Ampelisca* senza stazioni A3,A7,A10,A13,B3,B7,E3, E7, E10, E13.

Il fatto che gli Anfipodi siano buoni descrittori è noto e documentato, tuttavia per poter descrivere la struttura del popolamento è necessario che ogni esemplare venga correttamente identificato fino al livello di specie, cosa non sempre possibile, come per esempio durante la campagna B, di cantiere, in cui il 21% del popolamento è costituito da *Ampelisca* ind., in questo caso si è potuto arrivare ad identificarle solo fino al livello di Genere, ciò ha determinato una perdita di informazione durante lo studio del popolamento.

5.2 Discussioni dati genetici

La difficoltà o addirittura l'impossibilità di identificare alcune specie su base morfologica è frequente lavorando con organismi di piccole dimensioni. In particolare il genere *Ampelisca* presenta alcuni caratteri morfologici usati per l'identificazione molto piccoli e di difficile quantificazione e la normale variabilità intraspecifica, che gli organismi mostrano naturalmente, genera a volte confusione nell'identificazione. In tale contesto, si inserisce lo scopo secondario di questa tesi di dottorato, che riguarda l'utilizzo di indagini genetiche per comprendere sia la classificazione tassonomica sia la variabilità del genere *Ampelisca*.

Le analisi genetiche effettuate attraverso l'approccio molecolare, come il DNA barcoding, hanno lo scopo di capire e verificare se i risultati dello studio tassonomico sulle *Ampelisca*, ottenuti su base morfologica, mostrino una corrispondenza su base genetica (Hebert et al., 2003).

I dati genetici ottenuti, anche se in forma preliminare, forniscono informazioni su questo Genere formato da circa 20 specie, distribuite nei nostri mari, con un solo endemismo (*Ampelisca intermedia*); sono organismi prevalentemente bentonici, scavano nel sedimento, dove costruiscono tubi in cui vivono, hanno dimensioni piccole, al massimo intorno ai 12-15 mm.

Le specie di *Ampelisca* esaminate geneticamente sono state *A. brevicornis*, *A. diadema*, *A. typica*, *A. tenuicornis* e *A. ledoyeri*. (Fig 4.2.1)

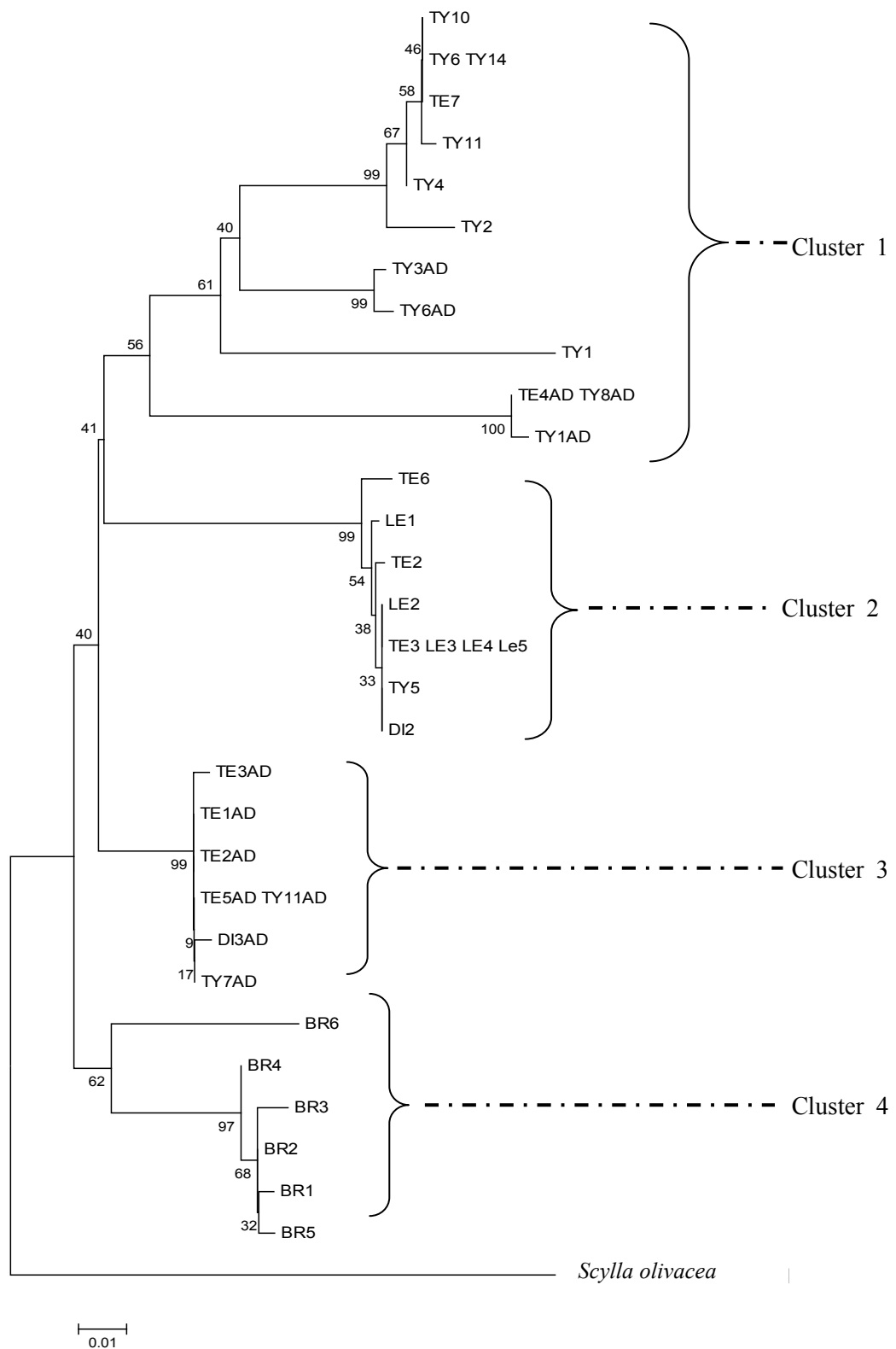


Figura 4.2.1 - Dendrogramma Neighbour Joining basato sulla distanza K2P, utilizzando come outgroup il crostaceo Decapode *Scylla olivacea*

I dati ottenuti hanno mostrato che l'attribuzione degli esemplari di *Ampelisca* su base morfologica comporta una frequente mis-identificazione degli stessi, come risulta dall'esame del dendrogramma NJ (Fig. 4.2.1). Qui è possibile notare come due individui di *A. tenuicornis* si posizionino nel Cluster della specie *A. typica*, mentre esemplari di *A. typica* si raggruppano in sub cluster di altre specie, inoltre i due esemplari di *A. diadema* analizzati vanno a posizionarsi entrambi nel Cluster del gruppo *A. ledoyeri* - *A. tenuicornis*.

La grande eterogeneità all'interno di alcune morfospecie è evidenziata anche dall'analisi molecolare della varianza (AMOVA), che mette in evidenza come la maggior parte della varianza, 60,36%, sia distribuita all'interno delle specie morfologiche, mentre solo il restante 39,64% è spiegato dal differenziamento tra le specie.

Una volta che gli esemplari sono stati raggruppati sulla base dell'affinità genetica si presentano quattro gruppi ben distinti, per i quali l'analisi della varianza molecolare mostra una variabilità genetica maggiore tra i gruppi, pari al 72,56%, mentre all'interno delle popolazioni risulta del 27,44% (Tab. XIV). Di questi quattro gruppi, uno comprende tutti e solo gli esemplari di *A. brevicornis*, di sola provenienza tirrenica (Cluster 4 in Fig. 4.2.1) ed è un gruppo geneticamente molto omogeneo ($K2P = 0,21-0,24$).

Nel Cluster 1 (Fig. 4.2.1) sono raggruppati gli esemplari di *A. typica* per i quali la suddivisione tra popolazioni tirreniche ed adriatiche è abbastanza netta, con la sola eccezione dell'esemplare TY1 che pur essendo di origine tirrenica va a legarsi al sub cluster delle *A. typica* adriatiche.

I Cluster 2 e 3 rappresentano il gruppo *A. ledoyeri* - *A. tenuicornis*, in particolare il primo riunisce specie tirreniche, il secondo quelle adriatiche.

I risultati ottenuti mostrano come il marcatore molecolare qui utilizzato sia idoneo sia ad identificare le specie studiate sia ad evidenziare la strutturazione geografica delle specie di *Ampelisca* analizzate.

Questi risultati genetici sono ancora preliminari, sia per il basso numero di esemplari studiati sia perché è stato impiegato un unico marcatore mitocondriale ma fanno rilevare che la sola identificazione morfologica porti a falsare il numero di individui campionati per specie, con evidente impatto sul calcolo degli indici che possono essere basati su tale parametro. Infatti come già detto in precedenza, l'importanza di identificare correttamente una specie è la base di partenza per poter usare correttamente gli organismi del bentos come indicatori delle modificazioni ambientali. Quindi, l'approfondimento della tematica relativa alla tassonomia sistematica supportata

dall'analisi genetica, può rivelarsi prezioso ai fini dell'identificazione delle diverse specie appartenenti alla comunità bentonica.

Infine i risultati ottenuti suggeriscono che il numero di specie attualmente riconosciute nel genere *Ampelisca* possa essere inadeguato rispetto al numero di reali entità biologiche esistenti (specie biologiche riproduttivamente isolate). Per avere conferma della necessità di un nuovo assetto tassonomico bisognerà però analizzare un maggior numero di campioni utilizzando anche marcatori nucleari.

6.CONCLUSIONI

Gli effetti sull'ecosistema marino che può generare la posa di una condotta sommersa possono essere in parte paragonabili ad altre attività che producono movimentazione del sedimento, come ad esempio i dragaggi, i cui effetti sono legati alle alterazioni delle percentuali delle frazioni granulometriche o alla risospensione di sostanze inquinanti e non (e.g. idrocarburi, metalli pesanti, materia organica). Queste alterazioni possono provocare la scomparsa e/o diminuzione di alcune specie sensibili e la comparsa di altre più tolleranti, possono, cioè, determinare modificazioni della struttura della comunità bentonica in esame (e.g. Deprez et al. 2010, Simonini et al. 2005, Nicoletti et al. 2006, Marusso et al. 2013).

Nonostante che nei nostri mari siano numerosi gli interventi di posa di condotte sottomarine (sia per il trasporto di energia elettrica che di idrocarburi), restano molto scarsi gli studi (sia in Italia che all'estero) che ne descrivono gli effetti sui popolamenti bentonici (e.g. Lewis et al., 2002).

Questa ricerca ha consentito di appurare come il popolamento a Peracaridi sia in grado di descrivere in maniera piuttosto simile all'intero popolamento bentonico le variazioni ambientali prodotte dalla posa di una condotta sottomarina durante le tre campagne (bianco A, cantiere B ed esercizio E).

Gli effetti da essa prodotti, identificabili soprattutto con lievi cambiamenti delle caratteristiche granulometriche, ed in particolare con l'aumento della frazione più fina, sono sì di entità molto modesta ma che tuttavia tale popolamento è riuscito a registrare.

Il nostro lavoro di Tesi ha mostrato, inoltre, come siano gli Anfipodi a dominare nettamente la comunità dei Peracaridi e, dalle informazioni rinvenute in letteratura, è nota la capacità di questo taxon di indicare diversi tipi di impatto come presenza di idrocarburi (Gesteira Gomez, et al., 2000), variazioni della concentrazione di ossigeno nel sedimento (Massamba N'Siala et al. 2008) o arricchimento organico (Fernandez-Gonzales & Sanchez-Jerez, 2011). In particolare, il genere *Ampelisca* include specie che sono riconosciute come indicatori ambientali (Gesteira-Gomez & Dauvin, 2000; Occhipinti-Ambrogi et al., 2005; N'Siala et al., 2008, Lowe & Thompson, 1997; Ingole et al., 2009, Bellan-Santini, 1971; Grahame e Hanna, 1989; Scipione e Lattanzi 1995; Sanchez-Moyano e Garcia Gomez., 1998; Conradi et al., 2000).

Abbiamo potuto verificare con i nostri dati, infatti, come questo genere, rispetto all'intero popolamento a Peracaridi, descriva gli effetti della perturbazione dovuta alla posa della condotta *off-shore* in maniera simile.

Anche altri taxa che appartengono all'Ordine dei Peracaridi sono in grado di indicare alterazioni ambientali, come alcune specie di Cumacei, per quanto riguarda gli effetti dell'eutrofizzazione

(Corbera et al. 1995); tra i Tanaidacei alcune descrivono l'arricchimento organico (J. A. de-la-Ossa-Carretero 2010), mentre tra gli Anfipodi sono indicatori della presenza di idrocarburi (Gomez-Gesteira et al. 2000), tuttavia il gruppo dei Peracaridi appare poco utilizzato come indicatore.

Infatti i pochi lavori che studiano questo taxon si limitano a descriverne la struttura in diversi ambienti, come ad esempio Moreira et al. 2008 e Lourido et al. 2008 descrivono il popolamento in acque basse su fondi mobili in Galizia (Spagna), o Thiel et al. 2003 che descrivono i popolamenti di peracaridi del Cile, Stransky et al. 2010, infine, descrivono le variazioni spaziali e temporali di questo taxon in Groenlandia. Conradi et al 2001 valutano gli effetti di alcune variabili ambientali sulla struttura del popolamento dei peracaridi nel sud della penisola Iberica. Per quanto riguarda le acque italiane, ed in particolare il Mare Adriatico, Paganelli et al. 2005 descrivono i popolamenti di peracaridi in due lagune in Adriatico

Data l'esigua bibliografia esistente per il Taxon dei Peracaridi e per il Mare Adriatico, il nostro Studio può incrementare le conoscenze sulla presenza e distribuzione delle specie che formano questo gruppo, con particolare riguardo alla risposta che queste possono fornire rispetto alla movimentazione del sedimento.

I risultati genetici preliminari, inoltre, ci confortano, stimolandoci a proseguire con questo tipo di studi, per meglio comprendere le relazioni filogenetiche ed ecologiche esistenti tra le diverse specie di *Ampelisca*. Tale studio potrebbe avere carattere "pionieristico", ovvero successivamente si potrebbe allargare il quadro di indagine ai principali taxa macrozoobentonici, molti dei quali ancora attendono un'analisi sistematico-tassonomico più attenta ed approfondita.

Complessivamente, quindi, i risultati ottenuti da questa Tesi di dottorato confermano, ancora una volta, come le comunità bentoniche assurgano oramai a valido e riconosciuto strumento di ricerca e di monitoraggio, attività per le quali le normative nazionali e comunitarie affinano sempre più i loro *dictata* legislativi. Mettere a punto dunque un strumento che sintetizzi la risposta dell'intera comunità bentonica potrebbe rilevarsi molto utile per tali attività, sia in termini di tempo che di costi.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON M.J. (2001) - A new method for non-parametric analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46
- ANDERSON, M. J. & J. ROBINSON, 2003. Generalised discriminant analysis based on distances. *Australian and New Zealand Journal of Statistics*, 45: 301-318.
- ANDERSON, M. J. & T. J. WILLIS, 2003. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology*, 84: 511-524.
- BELLAN- SANTINI D. (1971) – Etude des Crustacés amphipodes de la biocénose des Algues photophiles dans la région provençale. *Rapp. comm. int. Mer. Medit.*, 20(3) : 221-223.
- BERTASI F., COLANGELO M.A., ABBIATI M., CECCHERELLI V.U. (2007) – Effects of an artificial protection structure on the sandy shore macrofaunal community. THE SPECIAL CASE OF Lido di Dante (northern Adriatic sea). *Hydrobiologia* 586(1): 277-290.
- BILYARD G.R. (1987) - The value of benthic infauna in marine pollution monitoring studies.. *Mar. Poll. Bull.* 18:581-585.
- BORJA., A., FRANCO, J., PEREZ, V., 2000. A marine biotic index to the establish ecology quality of soft-bottom benthos within European estuarine coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 40, 1100-1114.
- BRAY, J. R. & J. T. CURTIS, 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.*, 27: 325–349.
- CASTELLI A., LARDICCI C., TAGLIAPIETRA D. (2003) – Il macrobenthos di fondo molle. In “Manuale di metodologia di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo”. Gambi M.C. e Dappiano M. (eds.). *Biol. Mar. Medit.*, 10 (Suppl.): 109-144.
- CLARKE K. R., AINSWORTH M. (1993) - A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series*, 92: 205–219
- COGNETTI G. e SARÀ M. (1972) – *Biologia Marina*. Edizioni Calderini, Bologna:439 pp.

- COLOSIO F., ABBIATI M., AIROLDI L. (2007) – Effects of beach nourishment on sediments and benthic assemblages. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 1197-1206.
- CONRADI, M., P. J. LOPEZ-GONZALEZ & J. C. GARCIA-GOMEZ, 1997. The amphipod community as a bioindicator in Algeciras Bay (Southern Iberian Peninsula) based on a spatio-temporal distribution. *P.S.Z.N. Mar. Ecol.*, 18: 97–111
- CONRADI M., LOPEZ-GONZALEZ P.J., CERVERA J.L., GARCIA-GOMEZ J.C. (2000) – Seasonality and spatial distribution of peracarids associated with the bryozoan *Bugula neritina* in Algeciras Bay, Spain. *Journal of Crustacean Biology*, 20(2):334-349.
- CORBERA, J. & M. J. CARDELL, 1995. Cumaceans as indicators of eutrophication on soft bottoms. *Scientia Marina*, 59(1) (suppl.): 63-69.
- CORREGIANI A., ROVERI M., TRINCARDI F. (1996) *Late Pleistocene and Holocene evolution of the North Adriatic Sea*. *Il Quaternario, Italian Journal of Quaternary Sciences*, 9, (2): 697-704.
- DE-LA-OSSA-CARRETERO, J. A., Y. DEL-PILAR-RUSO, F. GIMÉNEZ-CASALDUERO, J. L. SÁNCHEZ-LIZASO & J. C. DAUVIN, 2012. Sensitivity of amphipods to sewage pollution. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 96: 129-138
- DESPREZ, M., B. PEARCE & S. LE BOT, 2010. The biological impact of overflowing sands around a marine aggregate extraction site: Dieppe (eastern English Channel). – *ICES Journ.. Mar. Sci.*, 67: 270 – 277.
- DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch. Bull.*, 19: 11-15
- DE-LA-OSSA-CARRETERO J. A., DEL-PILAR-RUSO Y., GIMÉNEZ-CASALDUERO F., SÁNCHEZ-LIZASO J.L (2010) Sensitivity of tanaid *Apseudes latreillei* (Milne-Edwards) populations to Marine Environmental Research 69 (2010) 309–317 sewage pollution.
- EDISON GAS (1998): Terminale marino GNL da realizzarsi nel Nord Adriatico al largo del Delta del Po. Studio di Impatto Ambientale, Volume 3, Quadro di Riferimento Ambientale.

- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ & R. VRIJENHOEK, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 294–299.
- FRESI E., GAMBI M.C., FOCARDI S., BARGAGLI R., BALDI F., FALCIAI L. (1983) - Benthic communities and sediment types: a structural analysis. *P.S.Z.N.I. Marine Ecology*, 4(2): 101- 121
- FU Y-X.1997 Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- GARCÍA RASO J. E. AND. MANJÓN-CABEZA M. E (2002) an infralittoral decapod crustacean community of southern Spain affected by anthropogenic disturbances *Journal of Crustacean Biology*, 22(1): 83-90,
- GESTEIRA GOMEZ, J. L. & J. C. DAUVIN, 2000. Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities. *Mar. Poll. Bull.*, 40:1017–1027
- GRAHAME J., HANNA F. S. (1989) - Factors affecting the distribution of the epiphytic fauna of *Corallina officinalis* (L.) on an exposed rocky shore. *Ophelia*, 30: 113-119.
- GRAY J.S. (1981) – The ecology of marine sediments. Cambridge University Press, Cambridge: 185pp.
- GRAY J.S., CLARKE K.R., WARWICK R.M., HOBBS G. (1990) - Detection of initial effects of pollution on marine benthos: an example from the Ekofisk and Eldfisk oilfields, North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 66: 285-299.
- HEBERT, P.D.N., S. RATNASINGHAM & J. R. DEWAARD, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. London B: Biological Sciences*, 270: S96–S99.
- ICRAM (2005a): piano di monitoraggio ambientale per il progetto di realizzazione ed esercizio del Terminale marino di rigassificazione LNG nel nord adriatico
- INGOLE, B., S. SIVADAS, M. NANAJKAR, S. SAUTYA & A. NAG, 2009. A comparative study of macrobenthic community from harbours along the central west coast of India. *Environ. Monit. Assess.*, 154: 135-146.

- KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., AND NEI M., 2000 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University. Tempe, Arizona, USA.
- LA PORTA B., TARGUSI M., LATTANZI L., LA VALLE P., PAGANELLI D., NICOLETTI L. (2009) - Relict sand dredging for beach nourishment in the central Tyrrhenian Sea (Italy): effects on benthic assemblages. *Marine Ecology* 30 (Suppl. 1): 97–104.
- LA VALLE P., NICOLETTI L., FINOIA M.G., ARDIZZONE G.D. (2011) - *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment. *Ecological Indicators*, 11(5): 1426-1436.
- LEWIS, L. J., J. DAVENPORT & T. C. KELLY, 2002. A Study of the Impact of a Pipeline Construction on Estuarine Benthic Invertebrate Communities. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 55: 213–221.
- LOURIDO A., MOREIRA J., TRONCOSO J.S.(2008) Assemblage of peracarid crustacean in subtidal sediments from the Ria de Aldan (Galicia, NW Spain) *Helgol Mar Res* 62:289-301.
- LOWE, S. & B. THOMPSON, 1997. Identifying Benthic Indicators for San Francisco Bay. Regional Monitoring Program, Annual Report. San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA.
- MARÍN-GUIRAO, L., CESAR, A., MARÍN, A., LLORET, J., VITA, R., 2005. Establishing the ecological quality status of soft-bottom mining-impacted coastal water bodies in the scope of the Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 50, 374-445
- MARTIN D., BERTASI F., COLANGELO M.A., DE VRIES M., FROST M., HAWKINS S.J., MACPHERSON E., MOSCHELLA P.S., SATTA M.P., THOMPSON R.C., CECCHERELLI V.U., (2005) - Ecological impact of coastal defence structures on sediment and mobile fauna: evaluating and forecasting consequences of unavoidable modifications of native habitats. *Coastal Engineering* 52: 1027–1051.
- MARQUES J. C., BELLAN-SANTINI D. (1993) - Biodiversity in the ecosystem of the Portuguese continental shelf: distributional ecology and the role of benthic amphipods. *Marine Biology* 115: 555-564.

- MATZEN DA SILVA, J., S. CREER, A. DOS SANTOS, A. C. COSTA, M. R. CUNHA, F. O. COSTA & G. R. CARVALHO, 2011. Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). PLoS ONE, 6: e19449
- MARGALEF R. (1958). Information theory in ecology. General Systematics 3: 36-71
- MARUSSO V., TRABUCCO B., NONNIS O., MAGGI C., CECCHETTI S., NASCETTI G., ANGELETTI D. and CIMMARUTA R. 2013 effects of sediment management on amphipods community (crustacea) off latium coasts (tyrrhenian sea) and preliminary dna barcoding data on *ampelisca* (amphipoda) Crustaceana Monographia in press
- MARUSSO V., TRABUCCO B., BACCI T., VANI D., LOMIRI S., MAGGI C., NONNIS O., VIRNO LAMBERTI C., (2007) - Studio di un popolamento macrozoobentonico di fondo mobile in un area dall'Adriatico Centrale (Pescara) – Biol. Mar. Mediterr., 14 (2): 316-317
- MONTAGNA P.A. (2005) - Measuring Marine Benthic Community Response http://vpr.tamu.edu/antarctic/workshop/files/WP_Montagna.doc
- MOREIRA, JUAN;LOURIDO, ANTÍA;TRONCOSO, JESÚS S. (2008) Diversity and distribution of peracarid crustaceans in shallow subtidal soft bottoms at the Ensenada de Baiona (Galicia, N.W. Spain) *Crustaceana*, Volume 81, Number 9, , pp. 1069-1089(21)
- MORRI C., BELLAN-SANTINI D., GIACCONE G., BIANCHI C.N. (2003) - Principi di bionomia bentonica: definizione dei popolamenti e uso dei descrittori tassonomici (macrobenthos). In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds), “Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo”. Biol. Mar. Medit., 10 (Suppl.): 605-634.
- N'SIALA MASSAMBA G., GRANDI V., IOTTI M., MONTANARI G., PREVEDELLI D., SIMONINI R. (2008) Response of Northern Adriatic *Ampelisca* –*Corbula* community to seasonality and short-term hydrological Changes in the Po river. Marine Environmental Research 66 (2008) iusse 4:466–476
- NICOLETTI L., LA VALLE P., CHIMENZ GUSSO C. (2004) - Specie indicatrici: il caso *Corbula gibba* (Olivi, 1792). Biol. Mar. Med., 11(2): 273-277.

- NICOLETTI L., PAGANELLI D., GABELLINI M. (2006) - Aspetti ambientali del dragaggio di sabbie relitte a fini di ripascimento: proposta di un protocollo di monitoraggio. Quaderno ICRAM n. 5: 159 pp
- OCCHIPINTI-AMBROGI, A., D. SAVINI & G. FORNI, (2005). Macrobenthos community structural changes off Cesenatico coast (Emilia-Romagna, Northern Adriatic), a six-year monitoring programme. *Science of the Total Environment*, 353: 317– 328
- PAGANELLI D., SCONFIETTI R., MARCHINI A. (2005) The community of Crustacean Peracarids as indicator of spatial heterogeneity in two Adriatic lagoons: Sacca di Goro (Ferrara) and Lesina lagoon (Foggia) t <http://www.xvcongresso.societaitalianaecologia.org/articles/>
- PEARSON T.H., ROSENBERG R. (1978) - Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanogr. Marine Biology Annual Review*, 16: 229-311.
- PERES JM, PICARD J. (1964). Nouveau manuelle de bionomie bentique de la Mer Mediteranee. *Rec. Trav. St. Mar. Endoume*, 31 (47): 5-137.
- PIELOU EC. (1974). *Population and community ecology, principles and methodos*. Gordon and Breach Sci. Pubbl., New York. 424 pp
- POGGIALE J.C., DAUVIN J.C.(2001) Long-term dynamics of three benthic Ampelisca (Crustacea-Amphipoda) populations from the Bay of Morlaix (western English Channel) related to their disappearance after the ‘Amoco Cadiz’ oil spill *Mar Ecol Prog Ser*. Vol. 214: 201–209, 2001
- ROZAS. J.,. SÁNCHEZ-DELBARRIO J. C., MESSEGUER X & ROZAS, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497
- RUFFO S., (1982). The Amphipoda of the Mediterranean. Part 1. Gammaridea (Acanthonotozomatidae to Gammaridae). In: S. RUFFO, *Memoires de l’Institut Oceanographique*, Monaco, 13: 1-364.
- RUFFO, S., (1989). The Amphipoda of the Mediterranean. Part 2. Gammaridea (Haustoriidae to Lysianassidae). In: S. RUFFO, *Memoires de l’Institut Oceanographique*, Monaco, 13: 365-576.

- RUFFO, S., (1993). The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3. Gammaridea (Melphippidae to Talitridae). In: S. RUFFO, Memoires de l'Institut Oceanographique, Monaco, 13: 577-813.
- SANCHEZ-MOYANO J.E., GARCIA-GOMEZ J.C., (1998) – The artropod community, especially crustacea, as a bioindicator in Algeciras Bay (Southern Spain) based on a spatial distribution.
- SCIPIONE M.B. (1989) – Comportamento trofico dei crostacei Anfipodi in alcuni sistemi bentonici costieri. *Oebalia* XV (I):249-260
- SCIPIONE M.B., LATTANZI L. (1995) – Caratterizzazione del benthos di fondo mobile delle coste laziali: popolamenti ad Anfipodi. *Biologia Marina Mediterranea* 2 (2): 415-416.
- SHANNON CE, WEAVER W. (1949). The mathematical theory of communication. Urbana IL: University of Illinois Press. 117 pp
- SHEPARD F. P. (1954) Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. *Journal Sed. Petr.*, 24,151-158
- SIMBOURA, N., REIZOPOULOU, S., (2007). A comparative approach of assessing ecological status in two coastal areas of the Eastern Mediterranean. *Ecological Indicators* 7, 455-468.
- SIMONINI R., ANSALONI I., BONVICINI PAGLIAI A.M., CAVALLINI F., IOTTI M., MAURI M., MONTANARI G., PRETI M., RINALDI A., PREVEDELLI D. (2005) - The effects of sand extraction on the macrobenthos of a relict sands area (northern Adriatic Sea): results 12 months post-extraction. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 768–777.
- SIMONINI R., ANSALONI I., BONINI P., GRANDI V., GRAZIOSI F., IOTTI M., MASSAMBA-N“SIALA G., MAURI M., MONTANARI G., PRETI M., DE NIGRIS N., PREVEDELLI D. (2007) - Recolonization and recovery dynamics of the macrozoobenthos after sand extraction in relict sand bottoms of the Northern Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 64: 574–589.
- THIEL M., GONZÁLEZ E.R., BALANDA M.J. , HAYE P., HEARD R., AND WATLING L. (2003) Diversity of Chilean peracarids (Crustacea: Malacostraca) Contributions to the Study of East Pacific Crustaceans Vol. 2

THOMAS, J.D. (1993). Biological monitoring and tropical biodiversity in marine environments: a critique with recommendations, and comments on the use of amphipods as bioindicators.– *Journal of Natural History* 27: 795-806.

TOMASSETTI P., PERSIA E., MERCATALI I., VANI D., MARUSSO V., PORRELLO S. (2009) -Mariculture effects on macrobenthic assemblages in a western mediterranean site *Marine Pollution Bulletin* 58 533–541

THOMPSON, J. D., T. J.GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN & D. G.HIGGINS, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876–4882.

TRABUCCO, B. BACCI T., MARUSSO, V., LOMIRI S., VANI D., MARZIALETTI S., CICERO A.M., DI MENTO R. DE BIASI A.M, GABELLINI M., VIRNO LAMBERTI C. (2008) - Studio della macrofauna attorno alle piattaforme off-shore in Adriatico Centrale. *Biologia Marina Mediterranea*. 15 (1)

STRANSKY, B. & SVAVARSSON, J. (2010): Diversity and species composition of peracarids (Crustacea: Malacostraca) on the South Greenland shelf: spatial and temporal variation. *Polar Biology* 33:125-139

VATOVA A. (1949) La fauna bentica dell'alto e medio Adriatico. *Nova Thalassia* 1, 3: 1-110.

WARWICK RM, CLARKE KR. (1991) A comparison of some methods for analysing changes in benthic community structure. *J mar biol Ass UK* 71, 225-227.

DIVERSE Campagna A

Univariate Diversity indices

Data worksheet

Name: confronto03

Data type: Abundance

Sample selection: All

Variable selection: All

Sample	S	N	d	J'	H' (loge)	1-Lambda'
A03	0	0	****	****	0	****
A07	2	2	1,443	1	0,6931	1
A10	1	1	****	****	0	****
A13	2	4	0,7213	0,8113	0,5623	0,5
A16	4	6	1,674	0,8962	1,242	0,8
A19	4	39	0,8189	0,7689	1,066	0,6248
A23	7	15	2,216	0,8785	1,709	0,8381
A27	13	55	2,995	0,8715	2,235	0,8828
A29	6	19	1,698	0,9109	1,632	0,8304
A31	13	28	3,601	0,9216	2,364	0,9233

DIVERSE Campagna B

Univariate Diversity indices

Data worksheet

Name: Campagna B

Data type: Abundance

Sample selection: All

Variable selection: All

Sample	S	N	d	J'	H' (loge)	1-Lambda'
B03	6	18	1,73	0,7505	1,345	0,6993
B07	0	0	****	****	0	****
B 10	1	1	****	****	0	****
B 13	4	15	1,108	0,7128	0,9882	0,5524
B 16	11	70	2,354	0,8141	1,952	0,841
B 19	7	64	1,443	0,7962	1,549	0,7619
B 23	7	23	1,914	0,8809	1,714	0,8261
B 27	11	51	2,543	0,799	1,916	0,8243
B 29	10	28	2,701	0,8541	1,967	0,8519
B 31	9	21	2,628	0,9423	2,07	0,9048

DIVERSE Campagna E

Univariate Diversity indices

Data worksheet

Name: Campagna E

Data type: Abundance

Sample selection: All

Variable selection: All

Sample	S	N	d	J'	H' (loge)	1-Lambda'
E03	1	1	****	****	0	****
E07	0	0	****	****	0	****
E10	0	0	****	****	0	****
E13	4	11	1,251	0,895	1,241	0,7455
E16	7	24	1,888	0,9339	1,817	0,8587
E19	8	84	1,58	0,5995	1,247	0,5542
E23	2	3	0,9102	0,9183	0,6365	0,6667
E27	4	18	1,038	0,6376	0,8839	0,4771
E29	16	51	3,815	0,8054	2,233	0,8596
E31	9	13	3,119	0,9366	2,058	0,9231

PERMANOVA

Permutational MANOVA

Resemblance worksheet

Name: Resem8

Data type: Similarity

Selection: All

Transform: Square root

Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Permutation of residuals under a reduced model

Number of permutations: 9999

Factors

Name	Abbrev.	Type	Levels
Campagna	Ca	Fixed	3
profondità	pr	Fixed	2

PERMANOVA table of results

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Ca	2	10981	5490,6	1,9007	0,0032	9888
pr	1	12665	12665	4,3842	0,0001	9925
Caxpr	2	7432,3	3716,1	1,2864	0,1403	9885
Res	20	57776	2888,8			
Total	25	88366				

Details of the expected mean squares (EMS) for the model

Source	EMS
Ca	$1 \cdot V(\text{Res}) + 7,2727 \cdot S(\text{Ca})$
pr	$1 \cdot V(\text{Res}) + 10,8 \cdot S(\text{pr})$
Caxpr	$1 \cdot V(\text{Res}) + 3,6364 \cdot S(\text{Caxpr})$
Res	$1 \cdot V(\text{Res})$

Construction of Pseudo-F ratio(s) from mean squares

Source	Numerator	Denominator	Num.df	Den.df
Ca	$1 \cdot \text{Ca}$	$1 \cdot \text{Res}$	2	20
pr	$1 \cdot \text{pr}$	$1 \cdot \text{Res}$	1	20
Caxpr	$1 \cdot \text{Caxpr}$	$1 \cdot \text{Res}$	2	20

Estimates of components of variation

Source	Estimate	Sq.root
S(Ca)	357,75	18,914
S(pr)	905,2	30,087
S(Caxpr)	227,52	15,084
V(Res)	2888,8	53,748

PERMANOVA

Permutational MANOVA

Resemblance worksheet

Name: Resem8

Data type: Similarity

Selection: All

Transform: Square root

Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

Sums of squares type: Type III (partial)

Fixed effects sum to zero for mixed terms

Permutation method: Permutation of residuals under a reduced model

Number of permutations: 9999

Factors

Name	Abbrev.	Type	Levels
Campagna	Ca	Fixed	3
profondità	pr	Fixed	2

PAIR-WISE TESTS

Term 'Ca'

Groups	t	P(perm)	Unique perms	P(MC)
Before, During	1,5013	0,0019	9923	0,0297
Before, After	1,4939	0,0054	9925	0,0343
During, After	1,0869	0,2917	9920	0,309

Denominators

Groups	Denominator	Den.df
Before, During	1*Res	14
Before, After	1*Res	13
During, After	1*Res	13

Average Similarity between/within groups

	Before	During	After
Before	16,49		
During	14,893	20,875	
After	14,849	21,135	21,255

BEST Campagna A

Biota and/or Environment matching

Data worksheet

Name: Data2
 Data type: Environmental
 Sample selection: All
 Variable selection: All

Resemblance worksheet

Name: Resem1
 Data type: Similarity
 Selection: All

Parameters

Rank correlation method: Spearman
 Method: BIOENV
 Maximum number of variables: 5
 Resemblance:
 Analyse between: Samples
 Resemblance measure: D1 Euclidean distance

Variables

- 1 Sabbia(%)
- 2 Limo(%)
- 3 Argilla(%)
- 4 Sostanza organica totale(% s.s.)

Best results

No.Vars	Corr.	Selections
2	0,194	3;4
3	0,171	1;3;4
1	0,161	3
1	0,122	4
2	0,089	1;4
3	0,072	2-4
2	0,058	1;3
4	0,054	All
2	0,005	2;3
3	-0,013	1;2;4

BEST Campagna B

Biota and/or Environment matching

Data worksheet

Name: Data4
 Data type: Environmental
 Sample selection: All
 Variable selection: All

Resemblance worksheet

Name: Resem2
 Data type: Similarity
 Selection: All

Parameters

Rank correlation method: Spearman
 Method: BIOENV
 Maximum number of variables: 5
 Resemblance:
 Analyse between: Samples
 Resemblance measure: D1 Euclidean distance

Variables

- 1 Sabbia(%)
- 2 Limo(%)
- 3 Argilla(%)
- 4 Sostanza organica totale(% s.s.)

Best results

No.Vars	Corr.	Selections
2	0,396	2;4
1	0,374	4
1	0,360	2
3	0,301	1;2;4
2	0,270	1;4
3	0,268	2-4
2	0,243	1;2
4	0,241	All
2	0,179	3;4
3	0,158	1;3;4

BEST Campagna E

Biota and/or Environment matching

Data worksheet

Name: Data6
Data type: Environmental
Sample selection: All
Variable selection: All

Resemblance worksheet

Name: Resem3
Data type: Similarity
Selection: All

Parameters

Rank correlation method: Spearman
Method: BIOENV
Maximum number of variables: 5
Resemblance:
Analyse between: Samples
Resemblance measure: D1 Euclidean distance

Variables

- 1 Sabbia(%)
- 2 Limo(%)
- 3 Argilla(%)
- 4 Sostanza organica totale(% s.s.)

Best results

No.Vars	Corr.	Selections
1	0,321	2
2	0,251	1;2
2	0,200	2;4
3	0,197	1;2;4
3	0,195	1-3
2	0,195	2;3
1	0,179	1
4	0,157	All
3	0,148	2-4
2	0,141	1;4

CAP

Canonical analysis of principal coordinates

Resemblance worksheet

Name: Resem2

Data type: Similarity

Selection: All

Transform: Square root

Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

Factor for groups: date

Number of samples: 26

Choice of m: 15

CANONICAL ANALYSIS

Correlations

Eigenvalue	Correlation	Corr.Sq.
1	0.9672	0.9355
2	0.81	0.6561

Canonical coordinate scores

Sample	CAP1	CAP2
A07	-0.1978	0.0185
A10	-0.3103	-0.039
A13	-0.2734	-0.0994
A16	-0.2444	-0.129
A19	-0.3468	-0.0198
A23	-0.1074	-0.0114
A27	-0.2457	-0.1244
A29	-0.2924	0.263
A31	-0.2359	-0.0436
B03	0.1535	-0.0876
B 10	0.1928	-0.1922
B 13	0.1627	-0.0551
B 16	0.1301	-0.1808
B 19	0.2044	-0.2123
B 23	0.1399	-0.0242
B 27	0.225	-0.0861
B 29	0.0862	-0.2439
B 31	0.1228	-0.161
E03	0.1031	0.1962
E13	0.096	0.2007
E16	0.1471	0.1745
E19	0.1059	0.071
E23	0.0497	0.276
E27	0.0832	-0.0012
E29	0.1246	0.2354
E31	0.1271	0.2757

DIAGNOSTICS

m	prop.G	ssres	d_1^2	d_2^2	%correct
1	0.2023	2.0529	0.0767	0	38.462

2	0.3295	2.1655	0.1091	0.0212	34.615
3	0.4422	2.4612	0.1266	0.0318	15.385
4	0.5374	1.8963	0.5932	0.1065	30.769
5	0.6202	1.8774	0.596	0.1896	38.462
6	0.687	1.6978	0.7089	0.2949	38.462
7	0.7492	1.6251	0.7095	0.2956	38.462
8	0.8028	1.6077	0.7803	0.2981	50
9	0.8453	1.5388	0.8154	0.3429	53.846
10	0.8834	1.6027	0.8323	0.3639	50
11	0.9145	1.6281	0.848	0.3955	46.154
12	0.9421	1.8761	0.8639	0.4159	46.154
13	0.9649	2.0756	0.8672	0.4968	42.308
14	0.9852	2.1556	0.9115	0.5972	42.308
15	0.9998	2.1344	0.9355	0.6561	61.538

Cross Validation

Leave-one-out Allocation of Observations to Groups
(for the choice of m: 15)

Orig. group	Classified			Total	%correct
	A	B	E		
A	7	0	2	9	77.778
B	0	5	4	9	55.556
E	1	3	4	8	50

Total correct: 16/26 (61.538%)

Mis-classification error: 38.462%

Individual samples that were mis-classified

Sample	Orig.group	Class.group
A23	A	E
A29	A	E
B03	B	E
B 10	B	E
B 13	B	E
B 23	B	E
E03	E	B
E19	E	B
E23	E	A
E27	E	B

Outputs

Plot: Graph1

CLUSTER Popolamento Peracaridi

Hierarchical Cluster analysis

Resemblance worksheet

Name: Resem2

Data type: Similarity

Selection: All

Samples

1 A07
2 A10
3 A13
4 A16
5 A19
6 A23
7 A27
8 A29
9 A31
10 B03
11 B 13
12 B 16
13 B 19
14 B 23
15 B 27
16 B 29
17 B 31
18 E03
19 E13
20 E16
21 E19
22 E23
23 E27
24 E29
25 E31

Parameters

Cluster mode: Group average

Combining

1+2 -> 26 at 66,67
14+20 -> 27 at 58,11
21+27 -> 28 at 55,61
15+24 -> 29 at 52,8
7+29 -> 30 at 48,77
6+8 -> 31 at 44,47
16+23 -> 32 at 44,41
17+25 -> 33 at 43,32
28+31 -> 34 at 42,08
12+30 -> 35 at 42,03
5+13 -> 36 at 41,45
4+11 -> 37 at 41,19
32+35 -> 38 at 38,04
33+38 -> 39 at 36,31

34+39 -> 40 at 35,14
 37+40 -> 41 at 30,01
 9+41 -> 42 at 25,55
 19+22 -> 43 at 22,74
 36+42 -> 44 at 19,85
 10+18 -> 45 at 19,54
 43+44 -> 46 at 9,57
 3+45 -> 47 at 8,36
 46+47 -> 48 at 6,08
 26+48 -> 49 at 0,98

Outputs

Plot: Graph4

MDS Popolamento Peracaridi

Non-metric Multi-Dimensional Scaling

Resemblance worksheet

Name: Resem2

Data type: Similarity

Selection: All

Parameters

Kruskal stress formula: 1

Minimum stress: 0,01

Best 3-d configuration (Stress: 0,09)

Sample	1	2	3	%
A07	1,92	0,01	-0,04	7,0
A10	2,89	-0,09	-0,11	3,3
A13	-0,77	-1,08	-0,09	3,5
A16	-0,74	0,10	0,37	6,9
A19	-0,51	-0,35	0,62	1,8
A23	-0,26	-0,31	-0,01	2,8
A27	-0,29	0,27	0,30	5,0
A29	0,18	-0,10	-0,23	5,6
A31	-0,57	0,75	-0,20	4,7
B03	-0,49	-0,46	-0,84	4,0
B 13	0,05	0,56	0,37	4,4
B 16	0,28	0,35	0,12	6,4
B 19	-0,16	-0,41	0,61	7,9
B 23	-0,22	0,03	0,14	1,3
B 27	-0,23	0,52	0,05	2,8
B 29	-0,18	0,29	-0,43	3,4
B 31	-0,68	0,34	-0,01	3,1
E03	-1,28	-0,25	-0,44	3,4
E13	0,95	-0,28	-0,22	3,0
E16	0,23	0,10	0,10	4,0
E19	0,00	-0,03	0,30	3,1
E23	0,33	-0,85	0,21	1,4
E27	0,06	0,49	-0,21	3,7

E29	-0,18	0,34	-0,17	3,2
E31	-0,32	0,06	-0,20	4,3

Best 2-d configuration (Stress: 0,12)

Sample	1	2	%
A07	1,96	0,01	15,0
A10	3,43	0,00	8,1
A13	-1,06	0,75	2,0
A16	-0,56	0,09	6,1
A19	-0,33	0,56	2,4
A23	-0,32	0,21	3,1
A27	-0,13	-0,11	3,3
A29	0,12	0,09	4,8
A31	-0,38	-0,65	2,8
B03	-1,08	0,11	7,5
B 13	0,16	-0,38	3,3
B 16	0,26	-0,19	5,6
B 19	-0,18	0,54	5,5
B 23	-0,18	0,00	1,3
B 27	-0,18	-0,38	1,5
B 29	-0,32	-0,41	2,5
B 31	-0,54	-0,32	1,8
E03	-1,29	-0,25	2,8
E13	0,81	0,25	6,0
E16	0,18	-0,04	4,4
E19	-0,09	0,13	1,8
E23	0,25	0,76	1,7
E27	-0,01	-0,42	1,8
E29	-0,15	-0,26	2,0
E31	-0,37	-0,13	2,9

STRESS VALUES

Repeat	3D	2D
1	0,1	0,13
2	0,09	0,13
3	0,09	0,12
4	0,09	0,13
5	0,09	0,13
6	0,1	0,12
7	0,1	0,12
8	0,1	0,12
9	0,1	0,13
10	0,1	0,13
11	0,09	0,13
12	0,09	0,13
13	0,09	0,13
14	0,09	0,13
15	0,09	0,12
16	0,1	0,13
17	0,09	0,12
18	0,09	0,13
19	0,09	0,12
20	0,09	0,13
21	0,09	0,12

22	0,09	0,12
23	0,09	0,13
24	0,09	0,13
25	0,1	0,12

** = Maximum number of iterations used

3-d : Minimum stress: 0,09 occurred 17 times

2-d : Minimum stress: 0,12 occurred 10 times

Outputs

Plot: Graph5

Plot: Graph6

MDS Ampelisca

Non-metric Multi-Dimensional Scaling

Resemblance worksheet

Name: Resem1

Data type: Similarity

Selection: All

Parameters

Kruskal stress formula: 1

Minimum stress: 0,01

Best 3-d configuration (Stress: 0,01)

Sample	1	2	3	%
A03	1,08	-0,98	0,47	0,0
A07	-1,76	0,35	0,02	0,0
A10	-0,54	1,45	0,24	0,0
A13	1,66	1,23	0,19	0,8
A16	-0,20	-0,13	0,05	9,1
A19	-0,26	-0,12	0,04	3,5
A23	-0,25	-0,12	0,08	12,1
A27	-0,26	-0,09	0,08	4,2
A29	-0,26	-0,10	0,11	6,0
A31	-0,23	-0,12	0,10	5,2
B03	1,72	1,24	0,21	0,8
B07	-1,68	0,12	-0,51	0,0
B 10	1,09	-0,68	-0,67	0,0
B 13	-0,22	-0,11	0,07	4,0
B 16	-0,27	-0,11	0,10	5,5
B 19	-0,30	-0,09	0,07	5,9
B 23	-0,27	-0,13	0,08	3,6
B 27	-0,24	-0,13	0,09	4,6
B 29	-0,26	-0,11	0,07	6,5
B 31	-0,22	-0,14	0,08	3,4
E03	1,18	-0,90	-0,33	0,0
E07	0,25	0,08	-0,36	0,0
E10	0,50	1,01	-0,81	0,0

E13	1,21	-0,66	0,09	0,0
E16	-0,23	-0,10	0,07	3,9
E19	-0,25	-0,15	0,05	5,2
E23	-0,29	-0,10	0,00	3,9
E27	-0,26	-0,14	0,11	3,4
E29	-0,23	-0,11	0,11	4,4
E31	-0,23	-0,15	0,08	3,9

Best 2-d configuration (Stress: 0,01)

Sample	1	2	%
A03	-1,06	-1,99	0,0
A07	-1,85	-0,28	0,0
A10	0,18	0,57	0,0
A13	-1,14	-0,46	3,1
A16	0,50	0,11	5,2
A19	0,44	0,09	6,8
A23	0,45	0,11	5,0
A27	0,47	0,08	5,5
A29	0,45	0,08	5,6
A31	0,44	0,12	6,8
B03	-1,21	-0,42	3,1
B07	-1,66	0,30	0,0
B 10	-1,77	1,67	0,0
B 13	0,49	0,09	5,1
B 16	0,48	0,13	4,8
B 19	0,49	0,12	5,8
B 23	0,47	0,08	4,5
B 27	0,47	0,13	3,0
B 29	0,46	0,11	2,2
B 31	0,49	0,09	6,2
E03	0,92	-1,43	0,0
E07	-0,30	0,57	0,0
E10	-0,53	0,36	0,0
E13	-0,48	-0,90	0,0
E16	0,47	0,10	3,4
E19	0,49	0,10	6,6
E23	0,43	0,09	3,9
E27	0,46	0,10	2,9
E29	0,45	0,13	4,2
E31	0,48	0,13	6,2

STRESS VALUES

Repeat	3D	2D
1	0,01	0,01
2	0,01	0,01
3	0,01	0,01
4	0,01	0,01
5	0,01	0,01
6	0,01	0,01
7	0,01	0,01
8	0,01	0,01
9	0,01	0,01
10	0,01	0,01
11	0,01	0,01

12	0,01	0,01
13	0,01	0,01
14	0,01	0,01
15	0,01	0,01
16	0,01	0,01
17	0,01	0,01
18	0,01	0,01
19	0,01	0,01
20	0,01	0,01
21	0,01	0,01
22	0,01	0,01
23	0,01	0,01
24	0,01	0,01
25	0,01	0,01

** = Maximum number of iterations used

3-d : Minimum stress: 0,01 occurred 25 times

2-d : Minimum stress: 0,01 occurred 25 times

Outputs

Plot: Graph2

Plot: Graph3

MDS Ampelisca solo stazioni profonde

Non-metric Multi-Dimensional Scaling

Resemblance worksheet

Name: Resem3

Data type: Similarity

Selection: All

Parameters

Kruskal stress formula: 1

Minimum stress: 0,01

Best 3-d configuration (Stress: 0,08)

Sample	1	2	3	%
A16	-0,03	0,16	-1,10	2,7
A19	-1,24	-0,45	-0,15	3,6
A23	-0,68	0,73	0,33	12,9
A27	0,03	-0,24	0,39	2,5
A29	0,66	0,55	0,36	1,6
A31	0,54	0,59	-0,29	10,5
B 13	0,62	-0,38	-0,63	15,0
B 16	0,35	-0,78	0,23	7,4
B 19	-1,07	-1,22	0,06	6,5
B 23	-0,06	0,12	0,35	3,4
B 27	0,44	-0,33	0,21	2,0
B 29	0,66	0,31	0,47	1,5
B 31	-0,04	-0,03	-0,98	1,4

E16	0,27	0,21	0,06	7,2
E19	-0,37	-0,18	0,65	8,4
E23	-1,78	0,94	0,07	3,6
E27	0,96	0,05	0,28	5,9
E29	0,49	-0,28	0,19	1,6
E31	0,26	0,22	-0,51	2,4

Best 2-d configuration (Stress: 0,13)

Sample	1	2	%
A16	1,07	-0,73	10,2
A19	-1,06	-0,82	6,6
A23	-0,96	0,47	11,9
A27	-0,16	0,07	1,8
A29	0,25	0,78	1,8
A31	0,80	0,39	7,2
B 13	0,90	-0,21	7,7
B 16	0,01	-0,40	11,3
B 19	-0,91	-1,43	3,1
B 23	-0,19	0,26	2,9
B 27	0,25	0,00	3,4
B 29	0,23	0,71	1,3
B 31	0,90	-0,68	6,0
E16	0,15	0,29	4,2
E19	-0,50	-0,05	5,2
E23	-2,24	0,51	3,0
E27	0,45	0,74	4,6
E29	0,31	0,12	3,0
E31	0,71	-0,04	4,8

STRESS VALUES

Repeat	3D	2D
1	0,08	0,13
2	0,08	0,13
3	0,08	0,14
4	0,08	0,16
5	0,08	0,13
6	0,08	0,15
7	0,08	0,13
8	0,08	0,14
9	0,08	0,13
10	0,11	0,14
11	0,08	0,15
12	0,08	0,13
13	0,08	0,14
14	0,08	0,13
15	0,08	0,14
16	0,08	0,13
17	0,08	0,14
18	0,11	0,16
19	0,08	0,13
20	0,08	0,15
21	0,11	0,14
22	0,08	0,14
23	0,08	0,14

24	0,08	0,15
25	0,08	0,13

** = Maximum number of iterations used

3-d : Minimum stress: 0,08 occurred 22 times

2-d : Minimum stress: 0,13 occurred 10 times

Outputs

Plot: Graph6

Plot: Graph7