



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

## **DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E DELLA VITA**

**Corso di Laurea in Biologia ed Ecologia Marina**

### **Caratterizzazione e cambiamento nel tempo delle comunità bentoniche del Blue Hole delle Maldive**

Relatrici:

*Prof.ssa Monica Montefalcone*

*Dott.ssa Annalisa Azzola*

Correlatore:

*Prof.re Luigi Vezzulli*

Candidata:

*Aurora Peirano*

Anno Accademico 2020/2021



# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
1. Definizione di Blue Hole.....	1
1.1 Blue Hole nel mondo.....	3
2. Blue Hole delle Maldive.....	5
2.1 Caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua.....	7
2.2 Confronto con altri Blue Hole.....	12
2.3 Obiettivo.....	14
<b>Materiali e Metodi</b> .....	15
3. Analisi delle comunità bentoniche del Blue Hole.....	15
3.1 Analisi della comunità macro-bentonica.....	15
3.1.1 Attività di campo.....	15
3.1.2 Analisi fotografica ed elaborazione dei dati.....	16
3.1.3 Missing data treatments.....	17
3.1.4 Analisi statistiche.....	18
3.2 Analisi delle comunità batteriche.....	18
3.2.1 Attività di campo.....	18
3.2.2 Trattamento dei campioni.....	19
3.2.3 Analisi di laboratorio.....	21
<b>Risultati</b> .....	28
4. Caratterizzazione delle comunità macro-bentoniche e batteriche.....	28
4.1 Stabilità nella struttura della comunità macro-bentonica.....	29
4.2 Quantitativo di DNA contenuto all'interno dei campioni.....	36
<b>Discussione</b> .....	37
<b>Conclusione</b> .....	39
<b>Bibliografia</b> .....	40
<b>Ringraziamenti</b> .....	45

# Introduzione

## 1. Definizione di Blue Hole

Secondo la definizione di Mylroie et al. del 1995 “I Blue Hole sono cavità sotterranee che si sviluppano in banchi carbonatici; sono aperti in superficie e sono caratterizzati da acque soggette a marea di natura dolce, marina o mista; si estendono al di sotto del livello del mare per la maggior parte della loro profondità, e possono rappresentare accessi a grotte tramite passaggi”. I Blue Hole si formano tramite processi carsici, ovvero processi di dissoluzione e/o collasso di tipo fratturale di rocce carbonatiche, sotto l'influenza del cambiamento del livello del mare (Mylroie et al., 1995; Schwabe & Herbert, 2004; Gischler, 2011; Martin et al., 2012; Bishop et al., 2015; van Hengstum et al., 2019, 2020). La maggior parte dei Blue Hole si è formata durante l'ultimo periodo glaciale, quando il livello del mare era 100-120 m sotto quello attuale (Hatcher, 2006); grazie al successivo innalzamento del livello marino, queste cavità sono state sommerse; ciò è dipeso anche dalla vicinanza al litorale e dalla connessione alla falda acquifera (van Hengstum et al., 2011, 2019; Becking et al., 2011; Smith et al., 2011). I Blue Hole sono generalmente circolari, hanno pareti ripide e sono aperti in superficie, questo li rende influenzabili dalle maree e permette lo scambio anche a livello oceanico (Whitaker & Smart, 1997; Martin et al. 2012). I cosiddetti buchi blu possono svilupparsi orizzontalmente e apparire blu a causa di una combinazione del colore blu riflesso dal cielo con il bianco della sabbia carbonatica depositata sul fondo (Smart et al. 1988; Mylroie et al. 1995; Schwabe et al. 1997; Marano-Briggs 2000; Colantoni et al. 2003; Canganella et al. 2004). La maggior parte dei Blue Hole sono stati trovati e descritti alle Bahamas e alle Hawaii.

Sistemi simili ai Blue Hole sono i “Black Hole”: aperture verticali che si sviluppano dall'alto verso il basso che non hanno passaggi laterali e si trovano internamente alle isole in aree di transizione tra l'ambiente sommerso e la terra asciutta non dissimili da ambienti salini (Schwabe 1998; Schwabe e Herbert 2004). In entrambi i sistemi lo scambio d'acqua è fortemente limitato, i gradienti fisico-chimici sono altamente stabili e possono svilupparsi anche rigide condizioni anaerobiche con notevoli concentrazioni di acido solfidrico (H<sub>2</sub>S), non solo dipeso dalle loro caratteristiche geologiche ma anche dal ruolo significativo svolto dalla microfauna e flora autoctona.

I Blue Hole marini si distinguono inoltre dalle grotte anchialine, come cenotes e doline, perché, pur essendo anch'esse cavità, quest'ultime sono generalmente vuote o riempite di acqua dolce; sono collegate ad una falda acquifera ma è possibile che lo siano anche con il mare attraverso spaccature laterali della cavità (Bishop et al., 2015; Martin et al., 2012; Brankovits et al. 2017). I Blue Hole e le grotte anchialine possono contenere picnoclini multipli, associati a profili fisico-chimici complessi (Seymour et al., 2007) e presentare una caratteristica stratificazione: lo strato superiore è generalmente caratterizzato da lente meteorica, lo strato intermedio da zona di miscelazione (mixing zone), e nello strato profondo si trovano solitamente acque sotterranee, saline e anossiche (Beddows et al., 2007; Mylroie et al., 1995; Martin et al., 2012; Brankovits et al. 2017; van Hengstum et al., 2019). Questi sistemi sono quindi caratterizzati da stratificazione dovuta a caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua con cambiamenti repentini di temperatura, salinità, ossigeno disciolto e acido solfidrico (H<sub>2</sub>S). Inoltre, spesso contengono acque di fondo anaerobiche (Pohlman, 2011; Seymour et al., 2007; Canganella et al., 2007).

Blue Hole, Black Hole e grotte anchialine derivano quindi dallo stesso processo carsico e presentano generalmente ecosistemi insoliti con caratteristiche biogeochimiche uniche, grazie alla loro geomorfologia che li rende ambienti relativamente chiusi e con scambi d'acqua limitati (Sarbu et al., 1996; Pohlman, 2011). Diversi studi sono stati condotti sui sedimenti dei Blue Hole per la comprensione di fenomeni quali il cambiamento globale e gli uragani (Gischler et al., 2008; Tamalavage et al. 2018; Collins et al., 2015; Brown et al., 2014; van Hengstum et al., 2011, 2016, 2019, 2020; Wallace et al. 2019). I Blue Hole rappresentano infine dei laboratori naturali per lo studio di gradienti chimico-fisici estremi degli ecosistemi acquatici.

I Blue Hole sono di solito popolati da forme di vita ben adattate, distribuite in base alla concentrazione dei micronutrienti, dell'ossigeno, dell'acido solfidrico, e anche secondo i gradienti di temperatura e pH dell'acqua. Il biota di questi sistemi è generalmente caratterizzato da organismi procarioti (autotrofi e/o eterotrofi) adattati a condizioni anossiche e/o microaerofile e in grado di formare ampi biofilm su superfici rocciose o nei sedimenti del fondale.

Questi sistemi possono essere definiti estremi a causa della scarsità o assenza di irradiazione

solare, delle caratteristiche chimico-fisiche e dal fatto che spesso i procarioti risultano essere gli unici abitanti (Canganella et al., 2007).

## **1.1. Blue Hole nel mondo**

### **Great Blue Hole in Belize**

Il Blue Hole del Belize è una dolina formatasi nel Pleistocene. È situato nella laguna di Lighthouse Reef nell'atollo più orientale che costituisce parte della barriera corallina del Belize (Purdy e Gischler, 2003). È una cavità profonda di 125 m e presenta un diametro di 320 m. La forma cilindrica del Blue Hole nasce dalla dissoluzione carbonatica e dal crollo del tetto della grotta (Dill, 1977). Il crollo e l'afflusso di sedimenti ha lasciato una "cresta" di detriti circolari sul fondo della struttura. A circa 50 m di profondità sono presenti stalattiti di 2-3 m di lunghezza formatisi sub-aerialmente durante l'ultima fase del Pleistocene, quando il livello del mare era più basso di circa 30-45 m rispetto ad oggi (Dill, 1998).

L'apertura, il Blue Hole del Belize è circondata quasi completamente da un anello di scogliera corallina aperto in due soli punti a nord e ad est. Il fondale della laguna circostante è di circa 5 m di profondità. All'interno della scogliera è presente una pendenza approssimativamente di 30 gradi, con sedimento grossolano, che crea una zona di transizione fino alla parete verticale del Blue Hole a 10 m di profondità. A circa 90 m di profondità è presente un termocline, o picnocline, al di sotto del quale l'acqua nel Blue Hole è completamente anossica (Dill, 1977).

### **I Blue Hole delle Bahamas**

Alle Bahamas sono conosciuti diversi Blue Hole. Il minore è l'Inkwell Blue Hole che dista circa 550 m dalla costa, presenta un diametro di circa 16 m di ampiezza e ha una profondità di circa 8,5 m. Parte dell'entrata è occupata da un accumulo di detriti che restringe il passaggio. Il secondo Blue Hole delle Bahamas per ampiezza è il Church Blue Hole che dista circa 750 m dalla costa, ha un diametro di circa 32 m e una profondità di 4 m. Si apre a circa 1,5 m di profondità con una forma a coppa che si restringe al centro a circa 2,5 fino ad arrivare a 4 m di profondità dove si trova un accumulo di detriti che stabilisce il fondo del Blue Hole. Inoltre, è presente un passaggio che sembra estendersi a nord-est fino a raggiungere l'Inkwell Blue Hole. Un terzo è il Watling Blue Hole, più ampio dei precedenti

con un diametro di circa 63 m e una profondità di 8,5 m. Questo è il più vicino all'oceano e dista dalla costa circa 500 m. Presenta una parete di roccia artificiale, costruita nel 1800, che dai 0,6 ai 0,9 m di profondità circonda il Blue Hole e viene utilizzata dagli abitanti come recinto per le tartarughe marine. A nord-ovest fino ad una profondità di circa 7,3 m giace uno strato roccioso spesso 1-2 cm. A 7,5 m è stata identificata l'entrata di una grotta e si suppone che il passaggio continui in direzione nord-ovest. I sedimenti sul fondo sono posizionati in direzione sud-ovest verso l'ingresso della grotta e sono composti da ciottoli ricoperti di sabbia, limo e un materiale organico (M. Sampson & Guilbeault, 2013).

Il più ampio Blue Hole delle Bahamas è il Dean's Blue Hole che è stato scoperto nel 1992. Arriva ad una profondità di 200 m circa ed è situato nella baia ovest di Clarence Town a Long Island. La sua forma è pressoché circolare; in superficie presenta un diametro di circa 30 m ma spostandosi più in profondità si allarga e raggiunge i 100 m.

### **Sansha Yongle Blue Hole in Cina**

Nella zona sud del mare Cinese nel 2016 è stato scoperto un Blue Hole, chiamato Sansha Yongle Blue Hole o Dragon Hole. Questo si trova nell'atollo di Yongle, Paracel Islands e risulta essere il Blue Hole più profondo al mondo raggiungendo una profondità di 300 m. Ha una forma particolare che ricorda quella di una scarpetta da ballo posizionata in verticale, il suo diametro misura circa 130 m e si restringe in profondità fino a circa 32 m. Dalla superficie fino a 124 m le sue pareti sono verticali, dopodiché iniziano ad assumere un orientamento verso nord-est fino a 160 m e da questa profondità in poi ritorna ad assumere una forma sub-verticale fino al fondo. In anni recenti ha attratto l'attenzione di vari scienziati a causa delle sue proprietà uniche: i) la mancanza di immissione di acqua dolce; ii) una connessione sub-superficiale al mare e iii) la presenza di acqua profonda anossica (Xie et al., 2018).

### **Il Blue Hole di Dahab**

Il Blue Hole di Dahab è situato sulla costa est della Penisola del Sinai, nel golfo di Aqaba. La sua apertura è perfettamente circolare e di origine carsica, ne sono la prova le stalattiti e stalagmiti che costellano le sue pareti verticali. Il Blue Hole di Dahab si apre ad una profondità di circa 6 m e raggiunge i 110 m sul fondo, ha un diametro di circa 70 m ed è vicino

alla costa. A circa 60 m di profondità è presente un passaggio a forma di arco che lo collega con il mare aperto.

## 2. Il Blue Hole delle Maldive

Il Blue Hole delle Maldive (Figura 1) è stato scoperto casualmente nell'aprile del 2000 nel corso di una crociera scientifica organizzata da Albatros Top Boat in collaborazione con l'International School for Scientific Diving (ISSD) e l'Università degli Studi di Genova. L'anno successivo, nell'aprile 2001, è stata quindi organizzata una crociera scientifica volta all'esplorazione e ai rilevamenti nel Blue Hole nell'ambito della quale sono state condotte indagini geomorfologiche, sedimentologiche e biologiche. Sono stati quindi raccolti campioni di acqua a diverse profondità e sono stati definiti i profili del fondo con ecoscandaglio da superficie e con un sonar portatile da immersione.

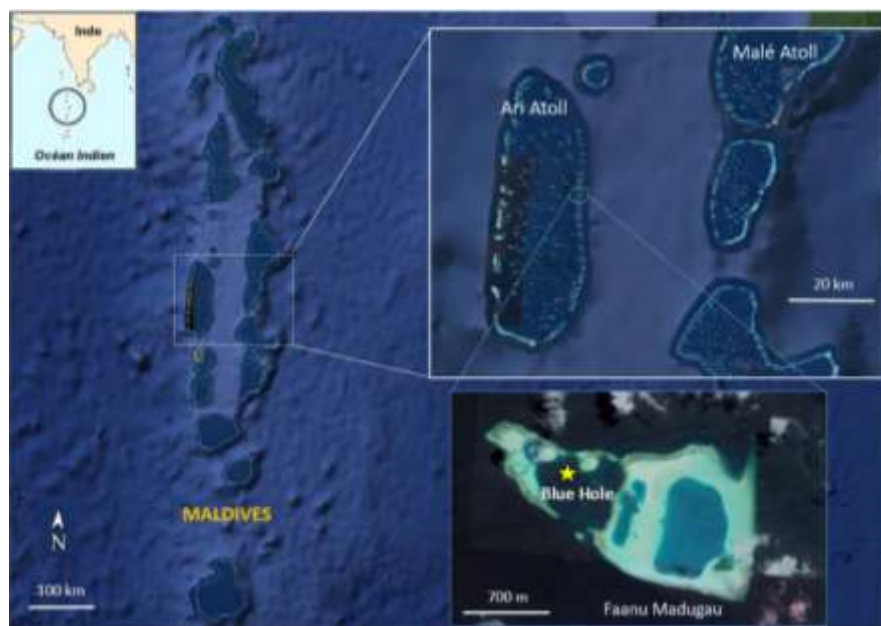


Figura 1: Blue Hole a Faanu Madugau.

A fronte delle indagini preliminari è stato possibile definire che il Blue Hole delle Maldive sia una cavità di origine carsica. Questo sistema si apre a circa 32 m di profondità e ha un diametro di circa 70 m che si allarga verso il fondo raggiungendo più di 80 m di profondità. La forma è identificabile come un tronco di cono avente la base leggermente più ampia sui lati nord ed ovest.

Attraverso lo studio dei campioni d'acqua è stata osservata una particolare stratificazione della colonna d'acqua: i) dai 32 m ai 45 m l'acqua risulta avere le stesse caratteristiche



dell'acqua marina presente appena fuori dall'apertura; ii) dai 45 m la colonna d'acqua risulta più torbida (a causa di flocculato in sospensione) e si osserva una riduzione di temperatura di due-tre gradi centigradi ed un chemioclino accentuato; infine iii) oltre i 60 m di profondità le condizioni diventano estreme a causa della drastica riduzione della concentrazione di ossigeno (ci si ritrova in un ambiente anossico, e un aumento di acido solfidrico, tossico per la maggior parte degli organismi viventi. In quest'ultimo strato i valori fortemente negativi di Eh determinano quindi condizioni riducenti, e il pH determina un aumento di acidità dell'acqua. Quest'ultimo strato risulta essere completamente buio a causa del particellato che caratterizza la fascia intermedia e non permette il passaggio di luce.

Nel 2004 inoltre sono stati svolti rilevamenti fotografici che hanno permesso di definire l'entrata del Blue Hole come impoverito: le comunità coralline sono caratterizzate per lo più da coralli molli, segnale di pregressi episodi di mortalità di fauna sessile, tutto ciò potrebbe essere dovuto ad occasionali fuoriuscite di acido solfidrico proveniente dal fondo. Le pareti del primo strato sono caratterizzate da organismi incrostanti, quali spugne e organismi filtratori. Spostandosi verso il fondo le pareti sono caratterizzate da incrostazioni di diversi colori: tuttavia questa fascia è costituita principalmente da roccia nuda. Nell'ultimo strato, invece, sono presenti colonie batteriche dal colore verde spento che formano delle frange che aumentano di lunghezza man mano che si scende in profondità.

A circa 50-60 m di profondità sono stati scoperti numerosissimi speleotemi sotto le volte del settore occidentale e settentrionale. Sono state infatti osservate stalattiti, stalagmiti e colonne nate dalla fusione delle due precedenti. Queste morfologie spiegano come il Blue Hole si sia formato a seguito di fenomeni carsici (Figura 2): nell'ultima era glaciale, iniziata circa 100.000 anni fa e terminata all'incirca 12.000 anni fa il livello del mare si è abbassato di circa 130 m. Questo ha esposto le scogliere coralline e il fondale a vari fenomeni che hanno plasmato particolari strutture come ad esempio alcune grotte. Finito il periodo glaciale il livello del mare si è alzato riportando in immersione tutte quelle morfologie che per molto tempo erano rimaste in emersione. Si ipotizza quindi che il Blue Hole si sia formato a fronte del crollo della volta di una grotta carsica sulla quale ha gravato l'innalzamento del livello del mare. In aggiunta, si ipotizza che la presenza e la successiva risalita dell'acido solfidrico all'interno di questa cavità abbia contribuito al crollo della volta e al modellamento delle pareti. Questo fenomeno è chiamato ipercarsismo in quanto la risalita di acido solfidrico, a contatto con l'ossigeno, reagisce formando acido solforico. Quest'ultimo, reagendo con il calcare, favorisce il rilascio di anidride carbonica con conseguente aumento della corrosione

delle pareti. Sull'origine dell'acido solforico sono state formulate diverse: i) la prima fa riferimento alla teoria sviluppata da Bottrell et al. (1991) per il Blue Hole delle Bahamas per la quale i solfati contenuti negli strati profondi (a causa della grande quantità di materia organica accumulata sul fondo) vengano ridotti da particolari enzimi batterici; ii) la seconda ipotizza la presenza di idrocarburi contenuti nella massa rocciosa sul fondo; iii) la terza, più plausibile, presuppone la produzione di acido solfidrico da parte di solfobatteri in condizioni anaerobiche (Colantoni et al., 2003).

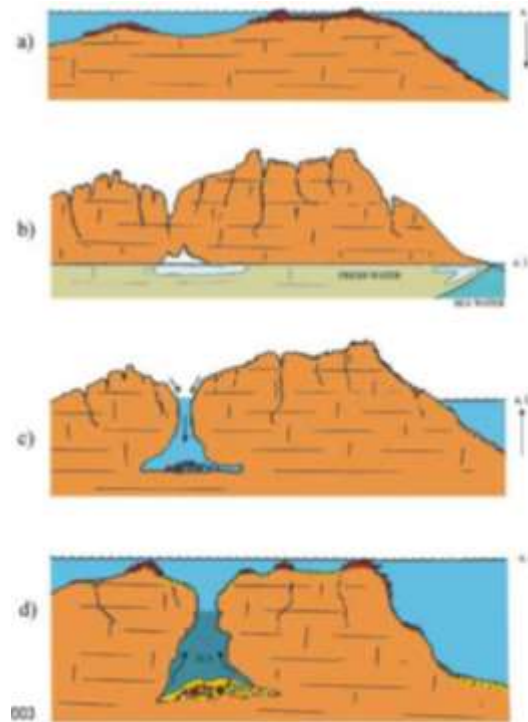


Figura 2: teoria del carsismo.

## 2.1. Caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua

I campioni raccolti nel Blue Hole delle Maldive sono stati analizzati al fine di analizzare le caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua a tutte le profondità, da 0 m a 80 m di profondità. Per la composizione ionica è stato utilizzato un metodo di campionamento suggerito da Giggenbach (1975) per i gas vulcanici e adattato alla colonna d'acqua. I risultati ottenuti dalle analisi e relativi a pH, Eh e temperatura mostrano una netta differenza tra lo stato d'acqua superficiale e quello al di sotto dei 40-50 m di profondità (Figura 3,4,5). A questa profondità si osserva una zona di transizione, il picnoclino, dove si registrano valori inferiori di temperatura, pH ed Eh (Figura 3,4,5).

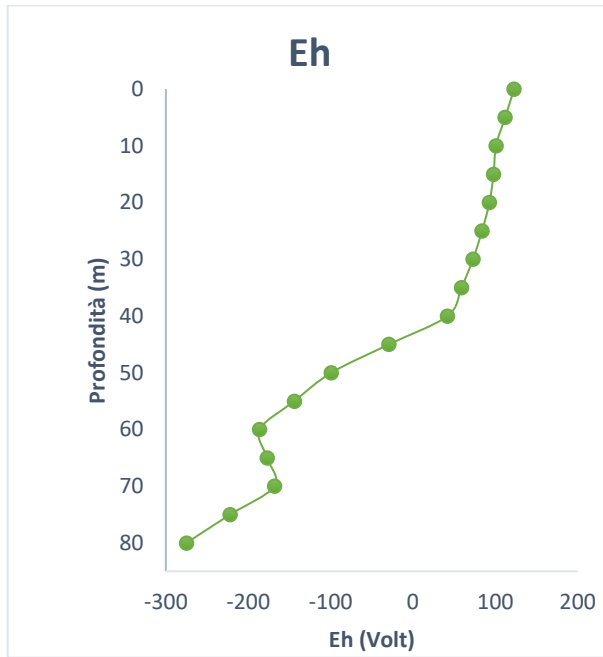


Figura 3: valori di Eh.

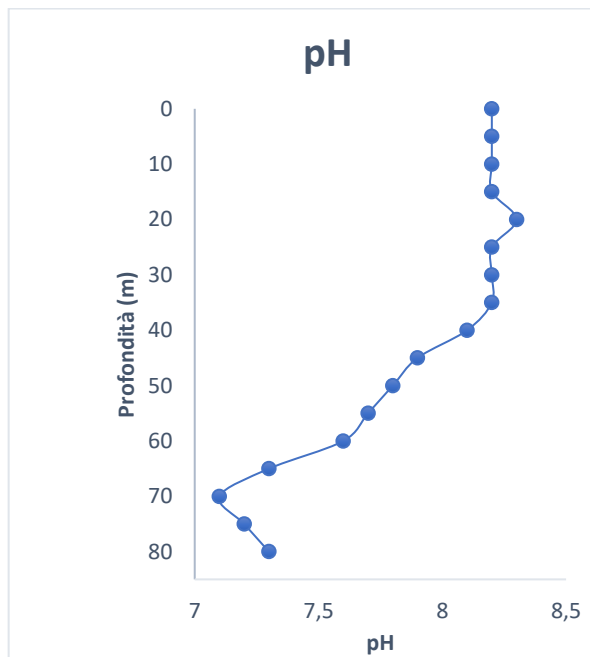


Figura 4: valori di pH.

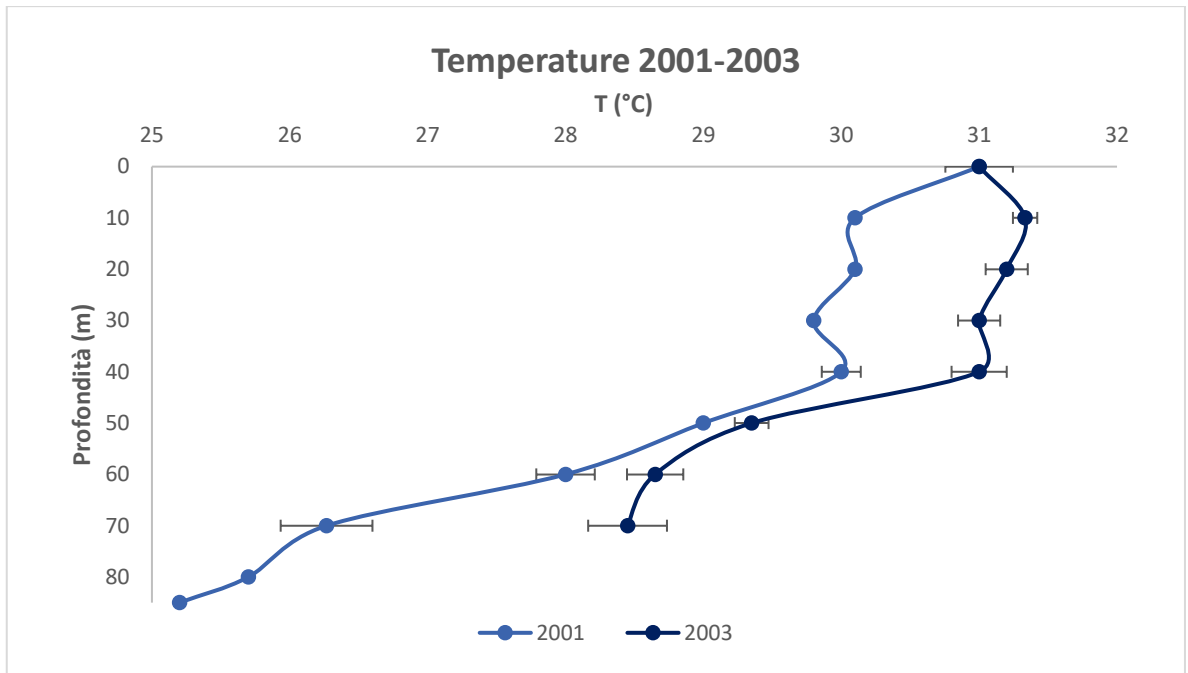


Figura 5: Confronto temperature anni 2001-2003.

Nell'ambito delle Crociere Scientifiche del 2017, 2019 e 2021, sono state nuovamente raccolti dati di temperature nel Blue Hole. Confrontando i dati raccolti nel 2001 e 2003 si osserva una differenza di un grado presumibilmente dovuta al diverso strumento utilizzato per il campionamento (Figura 6).

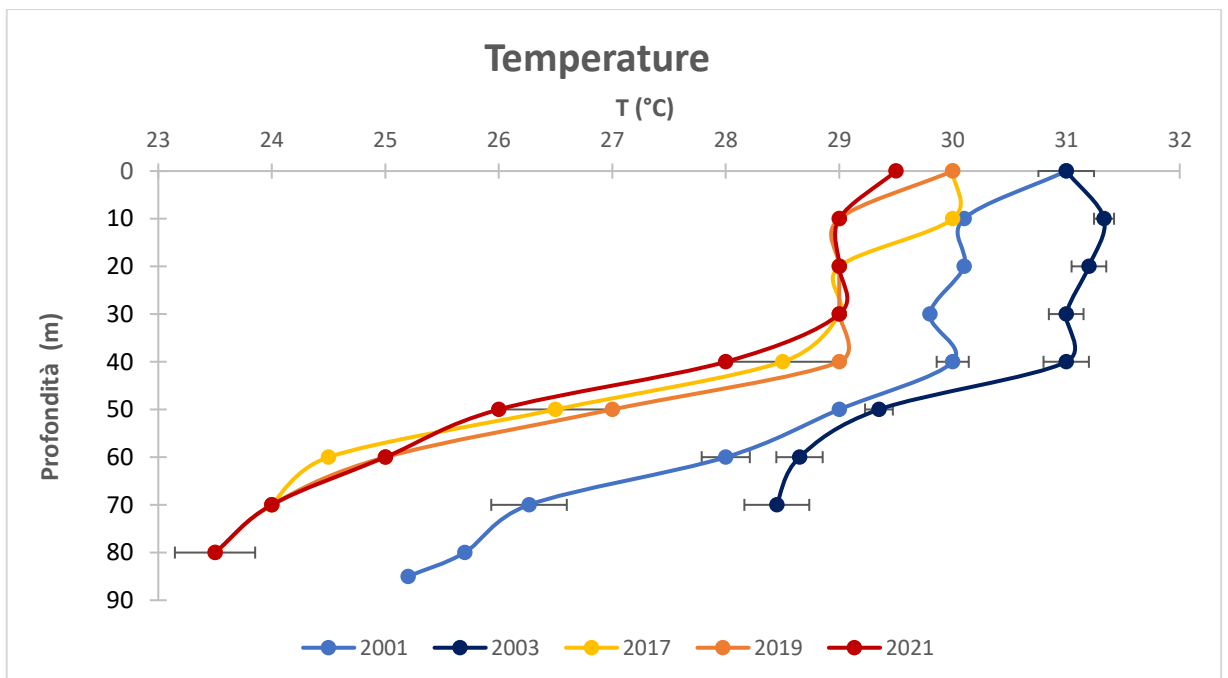


Figura 6: Confronto fra le temperature.

## Cationi e Anioni

La composizione dei campioni di acqua di mare, raccolti in flaconi pre-impregnati, ha mostrato una variazione significativa a partire dalla profondità di 50 m, mentre a valori inferiori di 50 m, i cationi presentano variazioni minori. Le principali variazioni sono registrate per  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , la maggior parte di essi è stata introdotta da processi biologici (Figura 7).

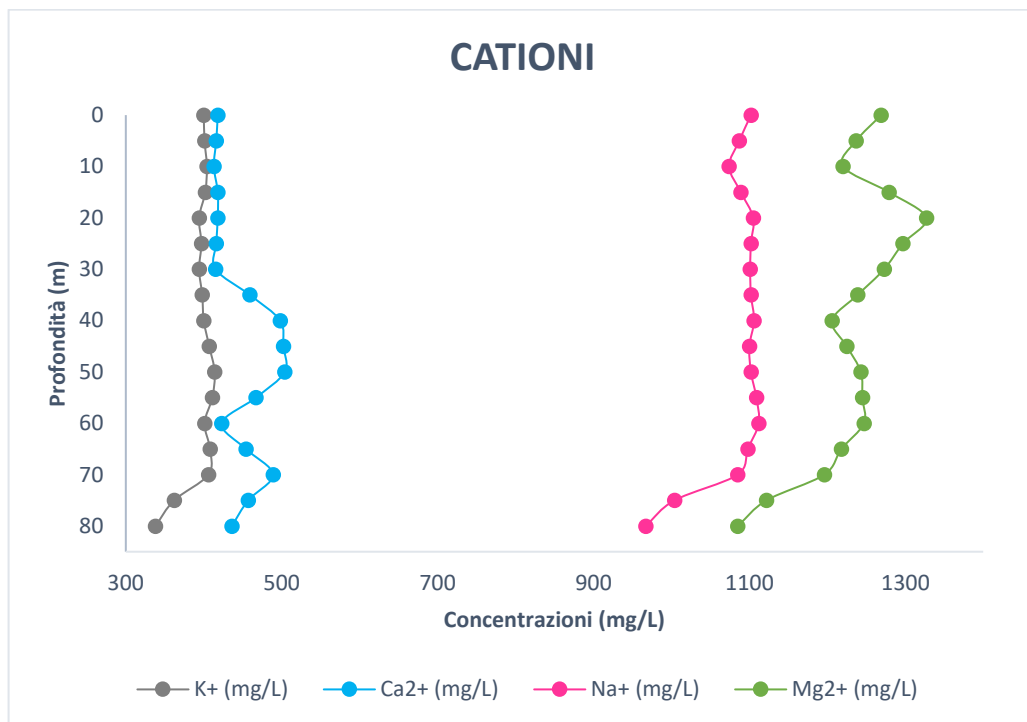


Figura 7: concentrazione cationi.

Per gli anioni sono state registrate variazioni maggiori: il valore dello ione bicarbonato è compreso tra 127 e 154 mg/L. Il valore del  $\text{Cl}^-$  rimane più o meno costante nei primi 50 m, mentre diminuisce costantemente verso il basso raggiungendo il tenore minimo a -78 m (17000mg/l).

Il solfato rimane costante fino alla profondità di 60 m, successivamente il suo contenuto aumenta fino al raggiungimento del fondo (Figura 8).

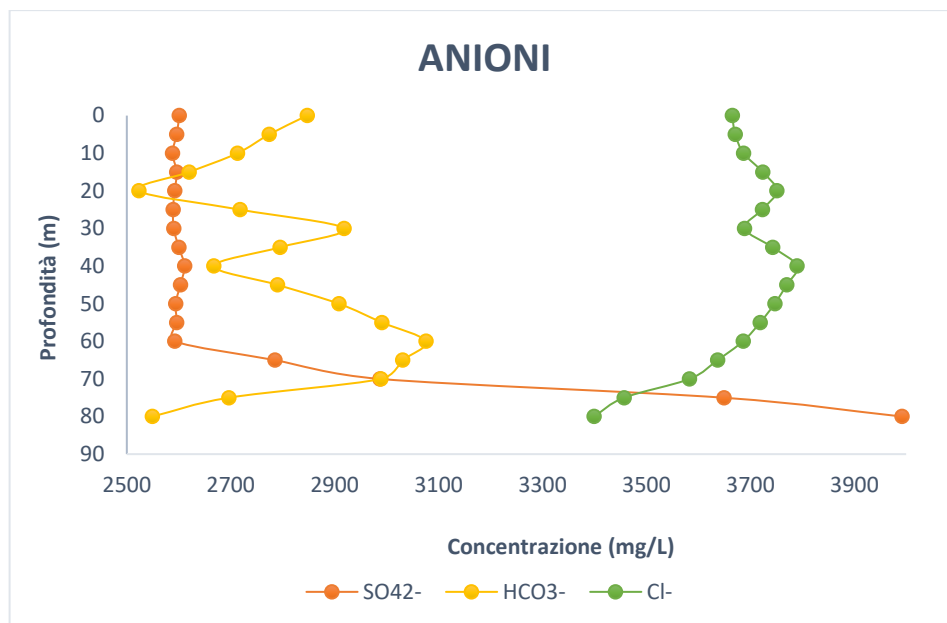


Figura 8: concentrazione anioni.

Per riassumere, nonostante i difetti minori locali, che sono per lo più legati a processi biologici variabili ed effetti di superficie (ovvero la CO<sub>2</sub> atmosferica e le precipitazioni), l'unica eccezione notevole è lo ione solfato. Tra i profili registrati vi è il contenuto decrescente generale dei soluti disciolti.

## Gas disciolti

Sono stati inoltre analizzati i composti volatili disciolti H<sub>2</sub>S e CO<sub>2</sub> (Figura 9). Dalle analisi è stato possibile definire una soluzione alcalina, che presenta un andamento approssimativamente simile dalla superficie al fondo. Le acque superficiali hanno una concentrazione di CO<sub>2</sub> pari alla CO<sub>2</sub> contenuta in atmosfera. La quantità di CO<sub>2</sub> diminuisce all'aumentare della profondità, raggiungendo le concentrazioni minime tra i 20 e i 40 m, probabilmente a causa dei processi biologici. Sotto i 40 m il contenuto di CO<sub>2</sub> aumenta notevolmente in maniera costante fino ai 78 m. L'H<sub>2</sub>S è al di sotto dello 0,5% dalla superficie fino ai 40 m, dopodiché aumenta arrivando all'8% sul fondo. L'O<sub>2</sub>, come per i due gas visti precedentemente, rimane costante fino ai 40 m di profondità dove diminuisce fino a concentrazioni minori del 5 mg/L alla profondità di 78 m, delineando un ambiente particolarmente anossico.

L'aumento di H<sub>2</sub>S e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in profondità suggerisce un'origine profonda per il H<sub>2</sub>S, probabilmente a causa dell'accumulo di materia organica.

La dinamica prevede uno spostamento di  $H_2S$  verso l'alto a profondità più basse, si ossida formando lo ione  $SO_4^{2-}$  e consumando  $O_2$ . I profili chimici appaiono come il risultato di diversi processi dinamici:

1. Equilibrio con i gas atmosferici;
2. *Uptakes* da processi biologici;
3. Aggiunta di  $H_2S$  e  $CO_2$  nelle acque profonde;
4. Equilibri redox per aumentare il contenuto di  $SO_4^{2-}$  e diminuire  $O_2$ .

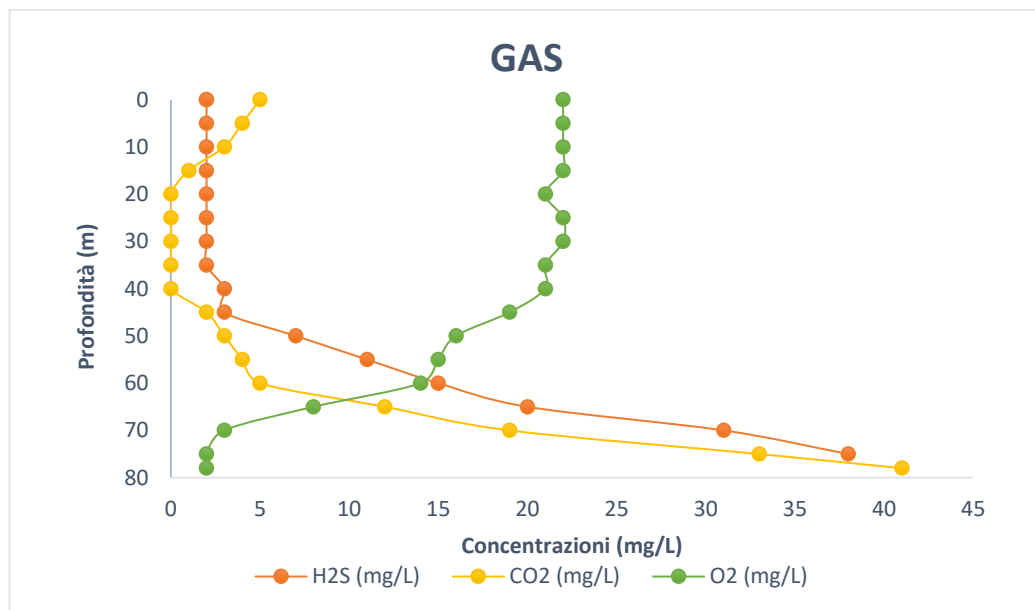


Figura 9: concentrazione gas disciolti.

## 2.2. Confronto con altri Blue Hole

Confrontando i parametri chimico-fisici descritti da Colantoni et al. (2003) per il Blue Hole delle Maldive, la stratificazione delle acque che ne consegue, risulta simile a quella presente nel Blue Hole del Belize nonostante le diverse profondità. Risultano invece differenti i valori di temperatura della colonna d'acqua dovuta alla differente temperatura atmosferica delle aree in cui questi due Blue Hole sono collocati. Come il Blue Hole del Maldive, quello in Belize presenta un termoclino/picnoclino, al di sotto del quale l'acqua risulta completamente anossica, in questo caso però a circa 90 m di profondità e non a 45-50 m (Dill, 1977). I profili di temperatura e conducibilità mostrano tre fasi negative tra 9-17 m, a circa 60 m e tra 80-100 m. I campioni di acqua prelevati al di sotto dei 100 m di profondità risultano particolarmente ricchi di  $H_2S$  e sono presenti alte concentrazioni di  $HCO_3^-$ , probabile

conseguenza della riduzione del solfato (Gischler et al., 2013). La temperatura dell'acqua nella laguna fluttua tra i 23 °C durante l'inverno e 29 °C in estate; la salinità oscilla, durante l'anno, tra i 37 e i 41 ‰. Le fluttuazioni di temperatura e salinità nella parte bassa della colonna d'acqua del Blue Hole del Belize è probabilmente minima (Gischler et al., 2003).

Per quanto riguarda i tre Blue Hole delle Bahamas è stata osservata visivamente una stratificazione non supportata però da studi specifici ad eccezione dei fattori di salinità e pH, che variano in funzione delle maree. L'andamento dei parametri chimici varia in base all'area in particolare dove differenti masse d'acqua si mescolano. Non sono state ad oggi definite per questi Blue Hole relazioni tra alcalinità,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , e durezza totale dell'acqua e si ipotizza che questi sistemi siano connessi all'oceano tramite condotti (Inkwell e Watling). Tuttavia, nel Church Blue Hole i valori di alcalinità,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , e durezza totale sono inversamente proporzionali a  $\text{Cl}^-$ , fino ad una profondità di 3 m, dove esso aumenta significativamente fino a 7800 mg/L. La riduzione di  $\text{SO}_4^{2-}$  dovuta all'attività batterica si verifica nella parte inferiore della mixing zone; il  $\text{SO}_4^{2-}$  sia riossidato nella sua parte superiore (Bottrell et al., 1991). Rispetto al Blue Hole delle Maldive e agli altri presenti alle Bahamas il Church Blue Hole presenta un andamento opposto per l'anione  $\text{Cl}^-$ .

Nel Sansha Yongle Blue Hole è stata riscontrata una stratificazione più complessa, con caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua molto differenti da quelle riscontrate all'esterno. In questo Blue Hole la colonna d'acqua è suddivisa da due termoclini che definiscono cinque strati. Il primo, fino a circa 13 metri, è caratterizzato da alte temperature e bassa salinità; tra i 13 e i 20 m si trova il termoclino stagionale dove la temperatura passa da 30 °C a 26 °C e la salinità aumenta; al di sotto fino a 70 m la temperatura si assesta a 25 °C e la salinità aumenta ancora. Il termoclino permanente si trova tra i 70 m e i 150 m dove le temperature diminuiscono fino a 15.7 °C e la salinità arriva a 34.50 ‰; sul fondo la temperatura rimane costante mentre la salinità aumenta ancora. L'ossigeno disciolto diminuisce passando da 233  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a circa 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$  nello strato del termoclino stagionale, mentre aumenta ad una profondità di circa 50 m; dopo il termoclino permanente la concentrazione di ossigeno diminuisce fino ai 90 m dove risulta assente e le acque sono anossiche. Lo ione solfuro è stato registrato a circa 80 m e ad una concentrazione minore di 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , invece passa velocemente da 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a 100 m, a 45  $\mu\text{mol L}^{-1}$  alla profondità



di 150 m, mantenendo questo valore fino al fondo della colonna d'acqua. Il potenziale redox è positivo fino a 80 m e diminuisce poi a -169 mV alla profondità di 90 m e a circa -300 mV nella zona più profonda che risulta essere anossica; il pH ha valori di 8.09 in superficie e nelle acque più profonde e anossiche arriva fino a 7.49.

Tra i 90 e 100 m è stato identificato uno strato definito “suboxic layer” tra i 90 e 100 m dove l'ossigeno ha valori minori a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  ed il solfuro risulta minore di  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Xie et al., 2019).

Se confrontato con il Blue Hole delle Maldive, il Sansha Yongle Blue Hole presenta differenze di temperatura, raggiungendo valori molto più bassi. Per quanto riguarda il pH nel Blue Hole delle Maldive questo fattore raggiunge a valori inferiori. Il potenziale redox mostra invece un andamento simile. Mentre nel Blue Hole delle Maldive è stato identificato un solo termoclino, nel Blue Hole cinese ne sono stati individuati due termoclini oltre ad un “suboxic layer”. Nel caso del Sansha Yongle Blue Hole la colonna d'acqua risulta anossica a partire dai 90 m di profondità, a differenza del caso delle Maldive dove lo strato anossico risulta ad una profondità di 60-70 metri dove aumenta invece il  $\text{H}_2\text{S}$ .

### **2.3 Obiettivo**

Ad una prima analisi il Blue Hole delle Maldive risulta un ambiente con caratteristiche differenti rispetto ai Blue Hole descritti in altre aree del mondo. Per tali caratteristiche, ad oggi considerate uniche, risulta quindi di interesse scientifico aumentare le conoscenze relative a questo peculiare ecosistema e alla sua risposta a pressioni globali.

Gli obiettivi di questo elaborato sono quindi:

- Caratterizzare la comunità macro-bentonica del Blue Hole delle Maldive attraverso l'analisi di fotoquadrati raccolti a 10 diverse profondità (i.e., 30,35,40,45,50,55,60,65,70 e 75 m);
- Valutare il cambiamento nel tempo nella struttura delle comunità macro-bentoniche, in particolare da un punto di vista trofico, grazie alla disponibilità di dati raccolti nel 2004 e nel 2019;
- Analizzare le comunità batteriche presenti nel Blue Hole delle Maldive attraverso il prelievo di campioni raccolti durante la Crociera Scientifica alle Maldive 2021.

# Materiali e metodi

## 3. Analisi delle comunità bentoniche del Blue Hole

### 3.1 Analisi della comunità macro-bentonica

#### 3.1.1 Attività di campo

Con l'obiettivo di caratterizzare le comunità macro-bentoniche delle pareti del Blue Hole delle Maldive, nel 2004 e nel 2019 sono stati raccolti campioni fotografici tramite tecnica non distruttiva (Sempere-Valverde and al., 2019). Il campionamento è stato svolto sulla parete rocciosa lungo tre transetti nel 2004 e lungo due transetti nel 2019 denominati A (corrispondente al transetto nord – N del 2019). A est (corrispondente al transetto est – E del 2019) e A ovest (non ripercorso nel 2019) (Figura 10).



Figura 10: transetti A e A est.

Lungo i transetti sono state eseguite, ogni 5 m di profondità, 3 repliche a partire da 35 m fino alla profondità di 75 m, tuttavia, in alcuni casi per il 2004 le repliche sono risultate mancanti.

Nel 2004 è stata utilizzata una macchina fotografica Nikos, con obiettivo 28 mm ed è stata utilizzata la dimensione della fotografia (i.e., 24x36 cm) come limite del quadrato.

Nel 2019 è stato invece utilizzata una macchina fotografica Canon Eos R con scafandro Nimar e un obiettivo da 24 mm e un quadrato 20x20 posizionato randomicamente sul fondo.

### 3.1.2 Analisi fotografica ed elaborazione dei dati

Allo scopo di caratterizzare le comunità bentoniche delle pareti rocciose del Blue Hole ogni fotoquadrato è stato analizzato visivamente rilevando la copertura percentuale di tutti gli organismi presenti al livello tassonomico più basso possibile (di solito la specie). Quando l'identificazione delle specie non è stata possibile, sono state definiti dei descrittori che raggruppano i diversi taxa in base alle caratteristiche morfologiche simili (i.e., OTU: unità tassonomiche operative). Sono state identificate 38 descrittori (Tabella 1), inseriti in una lista con opportuno codice di riferimento.

Ogni fotografia è stata analizzata grazie al confronto con le tavole per la stima visuale della copertura superficiale (Figura 11). Con i dati di cover è stata costruita una matrice (tempo x transetto x profondità) x descrittori.

DESCRIPTORS	CODE
sediment	sed
turf	turf
black	black
corrosion	cor
rock	rock
Hydrozoans	hyd
encrusting Corallinales	eco
<i>Pseudaxinella</i> sp.	Pse
yellow mat (Crysophyceae)	ymt
encrusting corals	cor
<i>Pachyseris speciosa</i>	Psp
massive orange sponge	mos
<i>Leucolathina translucida</i>	Ltr
green mat (Cyanobacteria)	gmt
<i>Sinularia brassica</i>	Sbr
<i>Peyssonnelia</i> sp.	Pey
encrusting ascidians	ea
encrusting orange sponge	eos
<i>Diendrophyllia gracilis</i>	Dgr
<i>Tubastraea faulkneri</i>	Tfa
bushy orange sponge	bos
golden mat (Diatom)	dmt
Skeleton of scleractinian	sos
large serpulids	lse
short filamentous bacteria (<1cm)	sfb
medium filamentous bacteria (1cm - 10cm)	mfb
long filamentous bacteria (>10cm)	lfb
<i>Mycedium</i> sp.	Myc
small serpulids	sse
massive white sponge	mws
<i>Clatrina</i> sp.	Cla
massive purple sponge	mps
<i>Phyllochaetoceros</i> sp.	Phy
Caryophylliidae	Car
encrusting purple sponge	eps
Antipatharians	Ant
barrel ascidians	bas
dead encrusting Corallinales	deco

Tabella 1: descrittori.

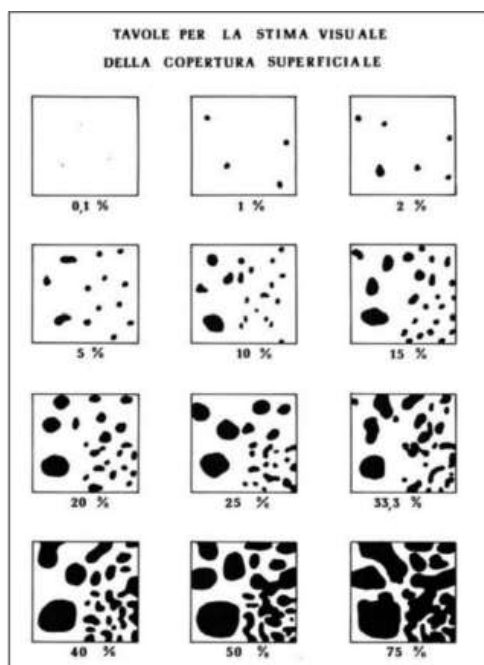


Figura 11: tavole cover.

### 3.1.3 *Missing data treatments*

Per le repliche mancanti relative al 2004 si è ricorsi al metodo *missing data treatments* descritto da Legendre & Legendre (1998), al fine di ottenere lo stesso numero di repliche alle dieci diverse profondità nel 2004:

1. Per le profondità a 40-45-50 m del transetto A est e per quelle a 40-45-60 m dell'A ovest, in cui erano presenti solo quattro repliche, si è semplicemente mediato i valori di ogni descrittore ottenendo quindi, per ognuno, il quinto valore che è stato aggiunto come replica finale;
2. Per la profondità di 35 m del transetto A le repliche erano nove per cui mediando si è ottenuta la decima replica. A questo punto in maniera casuale sono stati mediati i valori a coppie per ottenere infine cinque repliche finali; per il transetto A est invece si avevano solo tre repliche, quindi, sono stati utilizzati i sei valori del transetto A ovest, mediati randomicamente a gruppi di tre, e ottenute due repliche sono state aggiunte alla tabella definitiva;
3. Per la profondità di 60 m, per entrambi i transetti, non erano presenti reperti fotografici, per questo motivo sono state utilizzate le quattro repliche del transetto A ovest e randomicamente, a coppie, sono stati ottenuti altri due valori arrivando così a sei repliche. A questo punto sono state divise casualmente in due gruppi per poi mediare ulteriormente i tre valori a coppie, ottenendo due repliche che sono state aggiunte alle tre già esistenti, in modo tale da avere cinque valori sia per il transetto A sia per il transetto A est;
4. Per la profondità di 70 m, di entrambi i transetti, sono stati confrontati i campioni fotografici dei 70 m del 2019 e quelli di 65 m e 75 m dei transetti A e A est del 2004; quanto sopra al fine di valutare quali descrittori fossero simili a quelli presenti nei campioni del 2019 e quali fossero quelli ulteriori da considerare (ovvero corrosione e batteri filamentosi lunghi per il transetto A; mentre batteri filamentosi medi per il transetto A est). A questo punto sono state ottenute cinque repliche randomiche.
5. Per la profondità di 30 m dei campioni del 2004 i valori, che non sono stati raccolti durante la Crociera Scientifica alle Maldive, sono stati ricostruiti mediante l'osservazione dei campionamenti fotografici.

A questo punto, dopo aver ricostruito la matrice, inserendo tutte le repliche a partire dai 30 m e arrivando fino ai 75 m, relative ai due transetti e per i due anni, le repliche sono state ridotte da cinque a tre. Questo è stato fatto per ridurre l'errore. In questo caso in un primo

momento è stata ottenuta, mediando, una replica in più, con il fine di avere non più cinque repliche ma sei. Successivamente sono state mediate in maniera casuale due valori in modo tale da ottenere tre repliche random. Questo procedimento è stato svolto sia per i campioni del 2004 sia per quelli del 2019.

### 3.1.4 Analisi statistiche

Una volta ottenuta la matrice, i descrittori sono stati raggruppati in gruppi trofici come mostrato nella Tabella 2.

DESCRIPTORS	TROPHIC GUILDS	CODE
Corrosion scars Rock Rock, dead encrusting Corallinales Rock, skeleton of Scleractinian Sediment	ABIOTIC	cor rck dec sos sed
Microbial mat, green (Cyanobacteria)	MICROAUTOTROPH	gmt
Rhodophyta, Corallinales, encrusting Rhodophyta, Peyssonnelia sp.	MACROAUTOTROPH	eco Pey
Annelida, <i>Phyllochaetopterus</i> sp. Annelida, serpulids, large Annelida, serpulids, small Ascidians, encrusting Ascidians, zoocyanellate, barrel ( <i>Didemnum molle</i> ) Sponges, bushy orange Sponges, bushy, <i>Pseudaxinella</i> sp. Sponges, Calcispongiae ( <i>Clathrina</i> sp.) Sponges, Calcispongiae ( <i>Leucathrina translucida</i> ) Sponges, encrusting orange Sponges, encrusting purple Sponges, massive orange Sponges, massive purple Sponges, massive white	ACTIVE SUSPENSION FEEDERS (PUMPING/CILIARY)	Phy lse sse eas bas bos Pse Cla Ltr eos eps mos mps mws
Cnidaria, hard corals, zooxanthellate, encrusting Cnidaria, hard corals, zooxanthellate, encrusting ( <i>Mycidium</i> sp.) Cnidaria, hard corals, zooxanthellate, encrusting ( <i>Pachyseris speciosa</i> ) Cnidaria, soft corals, zooxanthellate ( <i>Sinularia brassica</i> )	COMBO	ecr Myc Psp Str
Bacterial filaments, long (>10cm) Bacterial filaments, medium (3cm - 10cm) Bacterial filaments, short (<3cm)	CHEMOTROPH	lfb mfb sfb
Microbial mat, golden (Diatom) Microbial mat, yellow (Crysophicidae)	MIXOTROPH	dmt ymt
Cnidaria, hard corals, axooxanthellate ( <i>Tubastraea faulkneri</i> ) Cnidaria, hard corals, azooxanthellate, Caryophyllidae Cnidaria, hard corals, azooxanthellate, <i>Dendrophyllia gracilis</i> Cnidaria, Hydrozoa Cnidaria, wire corals Antipatharia Turf	PASSIVE SUSPENSION FEEDERS	Tfa car Dgr hyd ant tur

Tabella 2: gruppi trofici.

Per ogni gruppo trofico la variazione di cover in base alla profondità nei due anni di studio (i.e., 2004 e 2019) è stata valutata tramite l'analisi univariata ANOVA.

## 3.2 Analisi delle comunità batteriche

### 3.2.1 Attività di campo

Durante la Crociera Scientifica condotta alle Maldive nel 2021 sono state dedicate due giornate al prelievo di campioni nel Blue Hole, utili per indagare al meglio la differenza tra

le comunità bentoniche e le differenze tra le comunità batteriche. Prima delle immersioni sono state siglate le falcon scrivendo con il pennarello nero indelebile la profondità e la lettera in base al numero della replica, questo è stato eseguito per evitare confusione e incertezza sia durante il campionamento sia nel momento del trattamento dei campioni. Le immersioni sono giunte fino ad una profondità di circa 80 m e durante la risalita si sono prelevati i campioni. Nelle due giornate, 28-29 aprile, sono stati utilizzati i seguenti strumenti: dodici falcon da 50 ml, sacchetti di plastica, un barattolo da 250 ml, tre falcon da 50 ml, martello, scalpello, elastici e una torcia.

Sono stati raccolti:

- Sei campioni di acqua con falcon da 50 ml alle profondità di 75 m, 50 m e 35 m;
- Sei campioni di solfobatteri con falcon da 50 ml alle profondità di 75 m, 70 m e 65 m;
- Due campioni di matre batteriche (verdi, gialle e ocra) alla profondità di 50 m, tramite la tecnica del grattaggio, utilizzano quindi scalpello, martello e sacchetti;
- Un campione di sedimento superficiale a 83.2 m di profondità con un barattolo da 250 ml;
- Tre campioni di solfobatteri a 75-70-65 m di profondità con tre falcon separate da 50 ml;
- Un campione di matre batteriche (verdi, gialle e ocra) a 50 m di profondità sempre con la tecnica del grattaggio.

### **3.2.2 Trattamento campioni batterici**

Appena completata la risalita i campioni sono stati trattati in barca. Sono stati utilizzati: guanti, filtri MILLIPORE (REF GTTP04700) fabbricate in policarbonato con porosità pari a 0,22  $\mu\text{m}$  e diametro di 47 mm, pipette, siringhe, pinzette, secchio per versare l'acqua raccolta in profondità da scartare, falcon nuove, acqua fisiologica, RNA later e formaldeide.

Iniziando con i campioni d'acqua: i 50 ml di acqua sono stati filtrati con l'utilizzo di un apposito filtro. Il filtrino inserito all'interno aveva la funzione di intrappolare tutto ciò che potesse trovarsi in acqua. Il filtro è stato poi reinserito all'interno della falcon servita per il prelievo dell'acqua ed è stato fissato con 2 ml di RNA later, una soluzione utile al fissaggio, ed è stato poi conservato in frigorifero a 4 °C per preservarne lo stato. Tale procedimento è

stato svolto separatamente per ogni singolo campione e tra un filtraggio e l'altro gli strumenti sono stati sterilizzati con acqua fisiologica.



*Figura 12: filtraggio dell'acqua.*

Successivamente sono stati trattati i campioni di solfobatteri: le falcon, contenenti i batteri, sono state svuotate dall'acqua, cercando di trattenere il più possibile i batteri raccolti. Sono stati quindi aggiunti per ogni falcon una quantità di 2 ml di RNA later, sono state sigillate e anch'esse riposte in frigorifero.

Infine, i campioni di matre batteriche: i frammenti di roccia, coperti da matre batteriche, sono stati inizialmente separati in base alla colorazione, grazie all'utilizzo di pinzette da laboratorio e riposti in falcon opportunamente siglate. Dopodiché sono stati aggiunti 2 ml di RNA later e anch'essi sono stati conservati in frigorifero.



*Figura 13: fissaggio con RNA later.*



Si è iniziato con il campione di sedimento: il barattolo è stato inizialmente svuotato dall'acqua superflua, facendo attenzione a non perdere parte del campione, e solo dopo questa operazione è stata aggiunta formaldeide al 10%, circa 100 ml. Il campione è stato sigillato e mantenuto a temperatura ambiente.

Subito dopo sono stati trattati i campioni di solfobatteri: le tre falcon con cui sono stati raccolti i batteri sono state svuotate il più possibile dall'acqua raccolta durante il campionamento, subito dopo è stata aggiunta una quantità di 2 ml di formaldeide al 10% per ciascuna. Le tre falcon poi sono state sigillate e sono state conservate in frigorifero a 4 °C.

Infine, sono stati trattati i campioni di matre batteriche: i frammenti di roccia, separati in base al colore, grazie all'utilizzo di pinzette da laboratorio, sono stati riposti in falcon e successivamente, in ognuna di esse, sono stati aggiunti circa 2 ml di RNA later, sigillati e riposti in frigorifero anch'essi a 4 °C.



*Figura 14: separazione matre batteriche.*

### **3.2.3 Analisi di laboratorio**

Le analisi sono state svolte nel laboratorio di Microbiologia Ambientale dell'Università di Genova. Sono stati analizzati solo i campioni di solfobatteri e matre batteriche in quanto i filtri, utilizzati per filtrare l'acqua, non hanno dato alcun risultato a causa della quantità ridotta di materiale presente.



In un primo momento i campioni sono stati prelevati dal frigorifero e condizionati a temperatura ambiente su un contenitore di polistirolo.

*Fase uno - rimuovere l'RNA later il più possibile senza intaccare il DNA presente:*

Tutti i campioni, sempre contenuti nelle falcon da 50 mL, sono stati posizionati nella centrifuga da banco e sono stati centrifugati ad una velocità di 4500 giri per 20 minuti a 4 °C in modo da “pellettare” il più possibile il materiale e togliere l'RNA later. Finita la centrifuga si è notata la separazione tra pellet e surnatante (RNA later) che è stato prelevato e messo da parte in provette. Questo passaggio è stato svolto sotto cappa (ambiente sterile) utilizzando una pipetta ed è stato aggiunto alle falcon, da 50 mL, 1 mL di PBS sterile (servito a disperdere il meno possibile il contenuto e utile per ottenere una matrice separatoria).



Figura 15: prelievo del surnatante.

Nei venti minuti di attesa è stato allestito il sonificatore, uno strumento che emette ultrasuoni.

Successivamente tutti i campioni sono stati vortexati per un minuto e sonificati per un altro minuto, tutto questo per tre volte. Tale procedimento ha favorito il distacco del materiale legato alle particelle. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 1000 giri per un minuto per eliminare il surnatante.

Subito dopo, sempre sotto cappa, è stato recuperato il surnatante (e poca parte solida per non perdere nessun elemento utile), probabilmente più di 1 mL, sempre con pipette e posizionate in eppendorf da 1,5 mL. Anche in questo caso è stata conservata la parte solida per eventuali controlli futuri.

A questo punto si è utilizzato una centrifuga da banco più piccola. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 10000 giri. La parte utile per procedere alle analisi è il pellet, mentre il surnatante è stato aggiunto alla matrice



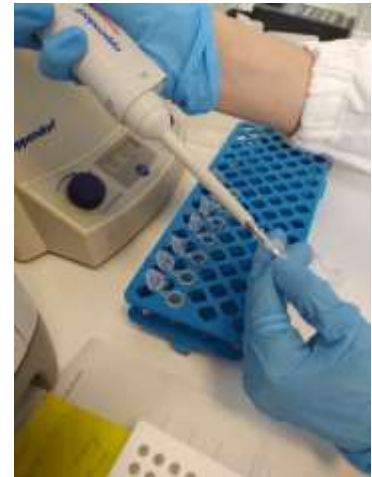
Figura 16: centrifuga da banco.

precedente che è stata messa da parte per eventuali analisi successive.

*Fase due – protocollo kit High Pure PCR Template Preparation Kit versione 22, REF 11796828001:*

Nuovamente sotto cappa, con opportune pipette, è stato tolto il surnatante escludendo il pellet. Inoltre, sono stati aggiunti in ogni campione 200 mL di PBS. Tutti i campioni sono stati vortexati per meno di un minuto, questo è stato fatto per rompere il pellet (in alcuni casi manualmente con l'utilizzo della pipetta).

Nelle eppendorf è stato aggiunto 5  $\mu$ L di lisozima, conservato a -20 °C nel freezer per rompere la parete dei batteri. Per omogenizzare il tutto è stata fatta una vortexata e uno spin, per far scendere il pellet, e successivamente i campioni sono stati incubati a 37 °C per 15 minuti.



*Figura 17: inserimento lisozima.*

Sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di Binding Buffer, per legare il DNA alla membrana, e 40  $\mu$ L di proteinasi K (inibitore di alcuni enzimi), prelevato dal freezer. I campioni sono stati vortexati velocemente e poi sono stati posizionati nel termoblocco a 70 °C per 10 minuti (anche l'elution buffer è stato preriscaldato alla stessa temperatura).



Figura 18: incubatrice piccola con campioni ed elution buffer.

Sono stati posizionati i tubi di raccolta, delle provette composte da due parti: una con il filtro e una parte di raccolta.

Finita l'incubazione il colore del campione è cambiato (verde chiaro), i campioni sono stati vortexati ed è stato aggiunto 100 $\mu$ L di isopropanolo, utile per condizionare il DNA e aiutare il binding. I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 13000 giri.



Figura 19: tubo di raccolta, parte filtro.

A questo punto, i campioni sono stati trasferiti, senza toccare il pellet sul filtro della cuvetta, e poi centrifugato a 8000 giri per un minuto.

È stato rimosso il filtro, dove era presente il DNA, ed il rimanente è sceso nella parte colletttrice del tubo. Il liquido è stato eliminato ed è stato posizionato un nuovo tubo al di sotto del filtro. Quindi si è aggiunto 500  $\mu$ L di buffer e il tutto è stato centrifugato a 8000 giri per un minuto.

Fase tre – lavaggio:

I campioni sono stati privati nuovamente della parte sottostante del tubo quindi ne è stato inserito uno nuovo. Si è aggiunto 500  $\mu\text{L}$  di Wash Buffer e sono stati centrifugati per un minuto a 8000 giri, in modo da lavare il DNA legato alla membrana. Questo passaggio è stato ripetuto due volte, ogni volta cambiando la parte sottostante del tubo.

Dopo di che è stato asciugato il filtro azionando la centrifuga a vuoto in modalità full speed (1000 giri per 10 secondi).

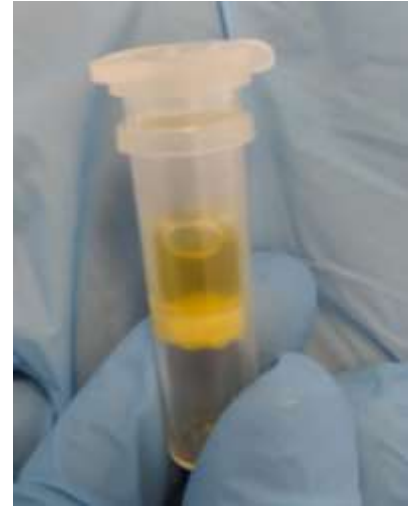


Figura 20: funzionamento filtro.

#### Fase quattro – eluizione:

Successivamente sono state usate delle cuvette al cui interno sono stati inseriti i tubi con i filtri. I campioni sono stati eluiti con 200  $\mu\text{L}$  di elution buffer riscaldato, posizionato bene al centro del campione, lasciandolo agire per uno/due minuti. Infine, è stata eseguita una centrifuga a 8000 giri per un minuto.



Figura 21: cuvette e filtro.

Il DNA eluito è stato recuperato dalla cuvetta e si è proceduto alla quantificazione.

Fase cinque - dosaggio:

Nel dosaggio è stata utilizzata una sonda fluorescente e, in base all'assorbanza che veniva espressa dallo strumento, si è compreso se il quantitativo di DNA fosse sufficiente o meno.

Sono state usate delle cuvette più piccole dove sono stati inseriti 98  $\mu\text{L}$  di sonda e 2  $\mu\text{L}$  di DNA, lavorando non a diretto contatto con la luce. Successivamente è stato vortexato e centrifugato velocemente lasciandolo 5 minuti al buio. Infine, l'analisi è stata svolta al QuantiFlour.



Figura 22: QuantiFlour.

Per estrarre il DNA dal sedimento è stato utilizzato, in laboratorio, il kit DNeasy Power Soil (REF 12888-100) della Qiagen. Inizialmente si è eliminato lo strato di formalina che si era formato in superficie, il sedimento è stato pesato, circa 0,25g, ed è stato inserito nel tubo con le beads. Il tubo è stato scaldato per circa un minuto a 70°C, vortexato, riscaldato per altri dieci minuti e nuovamente vortexato. Successivamente sono stati aggiunti 60  $\mu\text{L}$  di sol C1, esso contiene SDS e altri agenti richiesti per completare la lisi cellulare. Il tubo è stato agitato alla massima velocità per dieci minuti, in modo da poter lisare le cellule, e infine centrifugato a 10000xg per 30 secondi.

Al termine della centrifuga è stato trasferito il sopranatante in un tubo pulito, a cui sono stati aggiunti 250  $\mu\text{l}$  di sol C2. Subito dopo è stato passato in vortex per cinque secondi e incubato per cinque minuti in frigorifero. Al termine dei cinque minuti è stata svolta una centrifuga a 10000xg per un minuto.

Nuovamente è stato trasferito il sopranatante in un tubo pulito, a cui sono stati aggiunti successivamente 200  $\mu\text{L}$  di sol C3. Il tutto è stato vortexato e infine incubato per cinque minuti in frigorifero. Dopodiché è stato centrifugato per un minuto a 10000xg.

A questo punto il sopranatante è stato posizionato in un tubo pulito e si è portato il contenuto ad un volume di 1200  $\mu\text{L}$  con sol C4. Il tutto è stato vortexato per cinque secondi.

Sono stati inseriti 675  $\mu\text{L}$  nella colonnina a filtro ed essa è stata centrifugata a 10000xg per circa un minuto. Subito dopo è stato ripetuto il passaggio precedente in modo da poter utilizzare tutto il surnatante presente. Si è aggiunto 500  $\mu\text{L}$  di sol C5, essa è una soluzione di lavaggio a base di etanolo che serve per pulire il DNA legato alla parte silicatica del filtro del tubo che stiamo utilizzando. Il tutto è stato centrifugato a 10000xg per 30 secondi. La centrifuga è stata ripetuta una seconda volta a vuoto.

Infine, il contenuto è stato eluito in un tubo pulito con 50  $\mu\text{L}$  di sol C6, ovvero una elution buffer sterile, ed è stato centrifugato per circa 30 secondi a 10000xg. A questo punto il DNA risulta pronto per le analisi successive.

# Risultati

## 4. Caratterizzazione delle comunità macro-bentoniche e batteriche

### 4.1 Stabilità nella struttura della comunità macro-bentonica

Attraverso i grafici, riportati successivamente, si può notare il cambiamento del cover dei diversi gruppi trofici nel tempo, quindi nei diversi anni, e rispetto alle profondità:

- Per quanto riguarda il gruppo trofico “abiotic”, dove all’interno sono stati inseriti i descrittori di corrosione e roccia nuda, si può notare una differenza significativa a 35 m, a 50 m e a 55 m di profondità (Figura 23);
- Per “pumping active suspension feeders” si riscontra una differenza significativa solamente alla profondità di 35 m;
- Per “macroautotroph” si riscontra una differenza significativa alla profondità di 50 m;

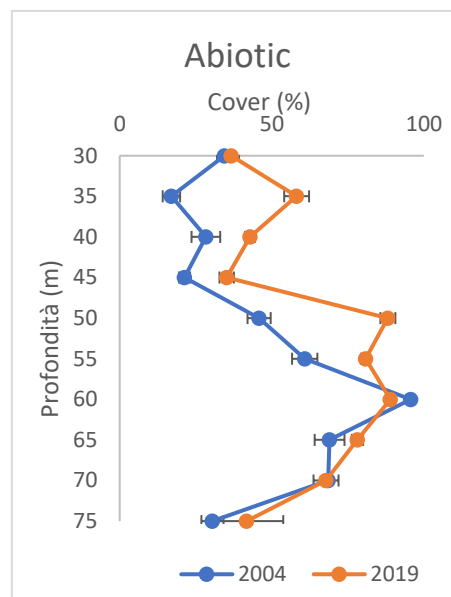


Figura 23: percentuale cover abiotic in base alla profondità.

- Per “microautotroph” si notano differenze significative alle profondità di 40, 50 e 55 m (Figura 24);
- Per i gruppi “ciliary active suspension feeders”, “chemiotroph”, “combo”, “mixotroph” e “passive suspension feeders” non si notano differenze significative alle diverse profondità;

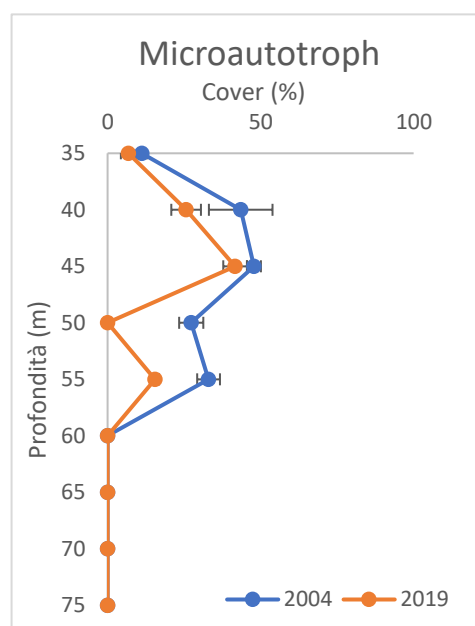


Figura 24: percentuale cover microautotroph in base alla profondità.



Successivamente i dati contenuti nella matrice sono stati trasformati utilizzando la formula  $\arcsin\sqrt{(x/100)}$  (Legendre & Legendre, 1998) ed è stata svolta un'analisi multivariata, Correspondence Analysis (CA), utilizzando il software gratuito PaSt (Hammer et al., 2001). Queste analisi sono state svolte al fine di valutare come è variata la comunità bentonica alle dieci profondità.

Per il comparto abiotico, l'ANOVA ha evidenziato differenze significative nei valori di cover tra il 2004 e il 2019 a 35 m, 45 m, 50 m e a 55 m di profondità. Nel 2019 la percentuale di cover della componente abiotica (i.e., sedimento, presenti in abbondanza, roccia nuda, scheletri di Sclerattinie e di Corallinales incrostanti) risulta più abbondante rispetto al 2004 (Figura 25), a tutte le profondità tranne a 60 m dove la percentuale risulta essere maggiore nel 2004.

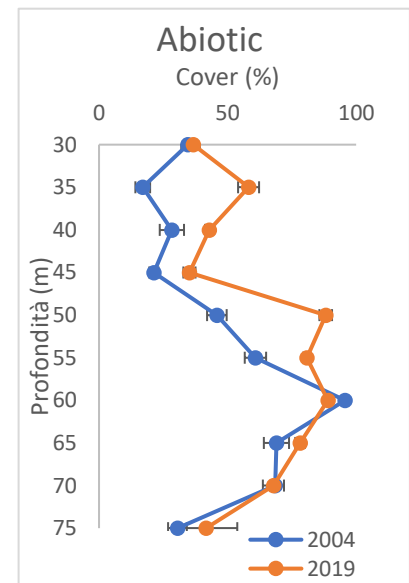


Figura 25: percentuale cover abiotica in base alla profondità.



Figura 26: a sinistra replica a 35 m nel 2004 - a destra replica a 35 m nel 2021.



Per quanto riguarda la categoria dei sospensivori attivi, ovvero spugne, massive ed incrostanti, ascidie e serpulidi, l'ANOVA ha evidenziato come a 35 m di profondità nel 2019 siano diminuiti significativamente rispetto al 2004 (Figura 27). In particolare, in entrambi gli anni, si osserva una riduzione a partire dai 40 m di profondità e dai 45 m al fondo il loro cover risulta 0%. La riduzione di tale gruppo trofico a 35 m si può notare anche osservando la comparazione che è stata fatta in figura 28 dove si nota un aumento del comparto abiotico nella replica del 2021 come è stato spiegato precedentemente.

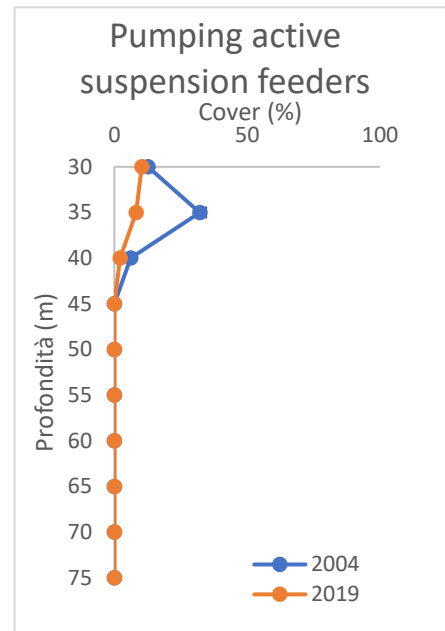


Figura 27: percentuale cover pumping active suspension feeders in base alla profondità.

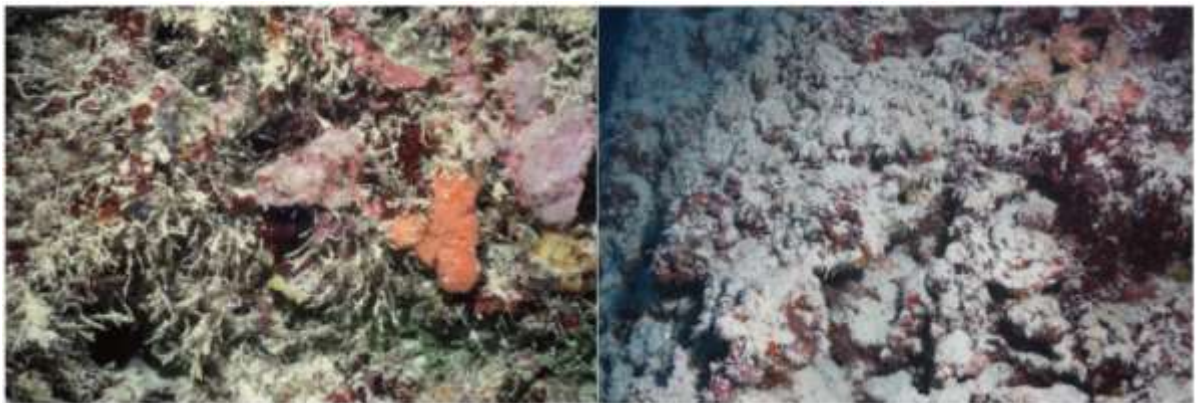


Figura 28: a sinistra replica a 35 m del 2004 - a destra replica a 35 m del 2021.

Per quanto riguarda la categoria dei macroautotrofi, organismi appartenenti al phylum Rhodophyta, si osserva una differenza significativa tra il 2004 e il 2019: a 50 m di profondità il cover si è ridotto drasticamente fino allo 0%. Osservando il grafico in figura 29 si può notare come nel 2019 già a partire dai 45 m il cover dei macroautotrofi risulti 0%, mentre nel 2004 dai 55 m di profondità. Il trend evidenzia un cover sempre maggiore nel 2004 tranne a 40 m dove è maggiore nel 2019.

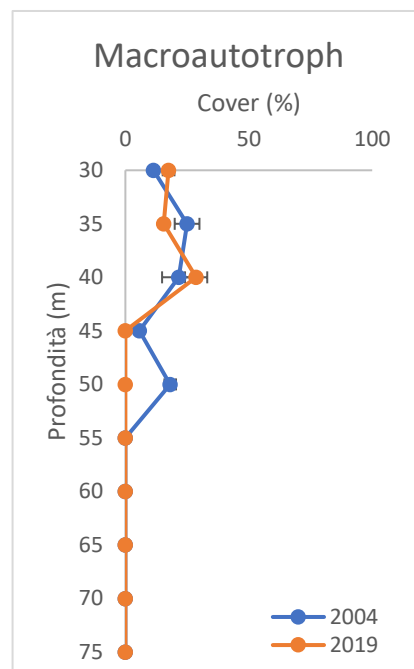


Figura 29: percentuale cover macroautotroph in base alla profondità.



Figura 30: a sinistra replica a 50 m nel 2004 – a destra replica a 50 m nel 2021.

In merito ai microautotrofi, ovvero le matte batteriche incrostanti, si ha un aumento del ricoprimento a partire dai 35 m con differenze significative a 40, 50 e 55 m di profondità. Si osserva come sia presente una percentuale di cover più alta nel 2004 rispetto al 2019. In entrambi i casi a 60 m scompaiono completamente. A 50 m di profondità si osserva in figura 32 che nel 2019 non risultano matte verdi sulle pareti del Blue Hole a differenza del 2004. Al posto di esse si nota un significativo aumento del comparto abiotico, quindi di roccia, segni di corrosione e sedimento.

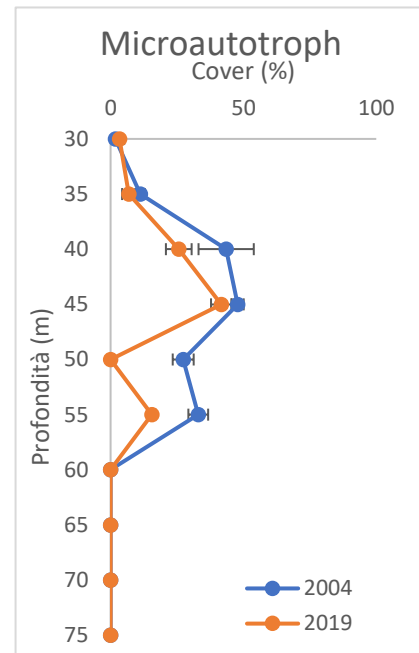


Figura 31: percentuale cover microautotroph in base alla profondità.



Figura 32: a sinistra replica a 55 m del 2004 - a destra replica a 55 m del 2021.

Prendendo in considerazione la categoria dei filtratori attivi ciliati, ovvero spugne e anellidi, non si osservano differenze significative alle varie profondità nei due anni (Figura 33); in entrambi i casi la percentuale di ricoprimento risulta molto bassa.

Per quanto riguarda la categoria combo (Figura 34), cnidari zooxantellati, si può osservare un picco del valore di ricoprimento a 30 m, sia per l'anno 2004 sia per l'anno 2019, ma senza nessuna differenza significativa.

Per la categoria dei filtratori passivi (Figura 34), ovvero principalmente cnidari, non si osservano grandi differenze significative nei due anni alle diverse profondità, ad eccezione di un picco del valore di ricoprimento a 35 m in entrambi i casi.

Stessa osservazione può essere rivolta ai mixotrofi (Figura 34), ovvero matte batteriche, dove si può notare un picco nei valori di cover a 45 m di profondità ma senza alcun cambiamento significativo nel tempo.

Nel caso dei chemiotrofi (figura 35), la comunità batterica, risultano assenti fino a 55 m di profondità per poi aumentare a 60 m e raggiungere il picco a 75 m in entrambi gli anni di osservazione.

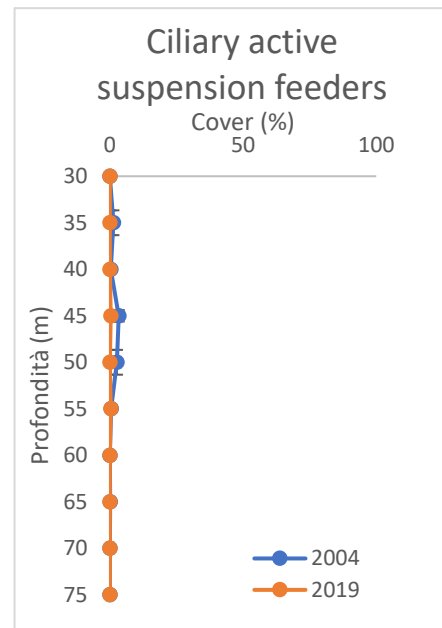


Figura 33: percentuale cover ciliary active suspension feeders in base alla profondità.

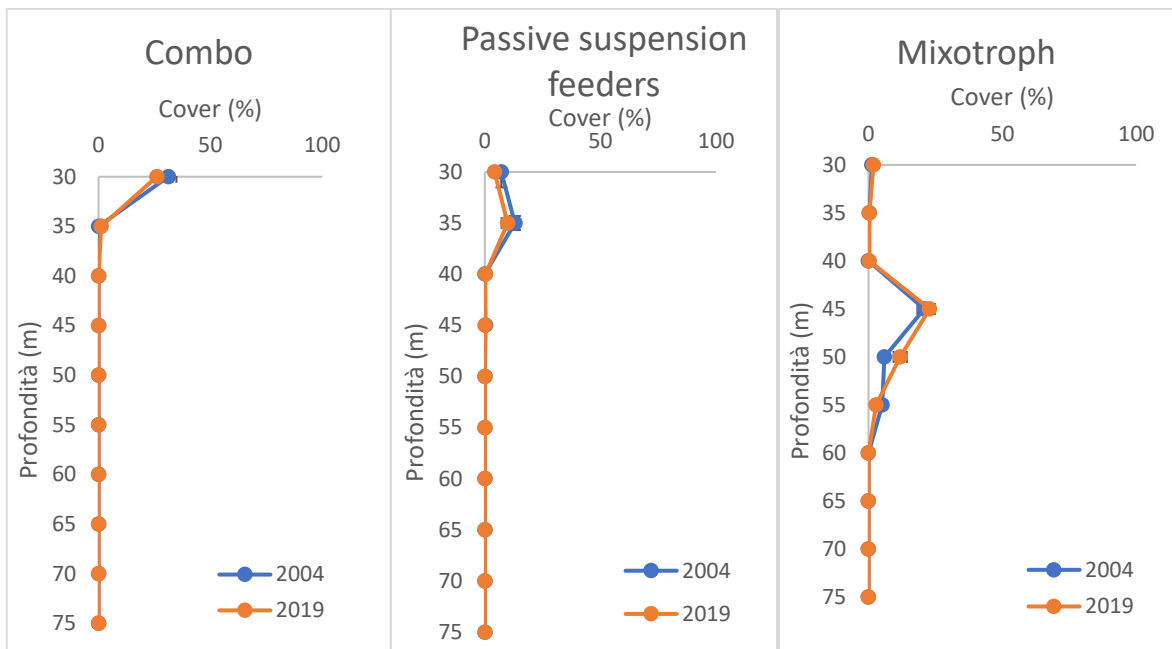


Figura 34: percentuale cover combo, passive suspension feeders, mixotroph in base alla profondità.

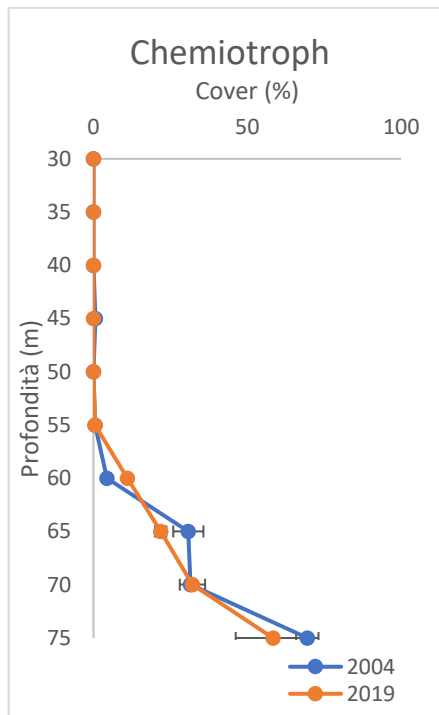


Figura 35: percentuale cover chemiotroph in base alla profondità.

Tramite analisi multivariata CA le repliche fotografiche sono state ordinate lungo un gradiente di profondità lungo l'asse primario con le repliche relative ai 30 m a sinistra e a quelle dei 75 m a destra. I due assi principali spiegano rispettivamente il 48,2% e il 27,5%

della variazione totale. Tale analisi ha permesso di identificare tre differenti “comparti” lungo il gradiente batimetrico:

- 1- Il primo comprende le repliche relative alle profondità tra i 30 m e 40 m, caratterizzate da descrittori appartenenti ai gruppi trofici: combo, filtratori passivi, filtratori attivi pompanti e macroautotrofi. A causa delle loro caratteristiche trofiche si può definire un comparto ad elevato metabolismo energetico;
- 2- Il secondo comparto comprende le repliche relative alle profondità di 45 m e i 55 m, caratterizzate da organismi appartenenti ai gruppi trofici: microautotrofi, mixotrofi e filtratori ciliati attivi. Questo caso il comparto può quindi essere definito a basso metabolismo energetico;
- 3- Il terzo e ultimo comparto comprende le repliche relative alle profondità tra i 55 m e i 75 m ed è caratterizzato solamente da organismi chemiotrofi.

L'unica categoria che non rientra nei tre raggruppamenti è l'abiotico che rimane comunque molto spostato verso i 50-55 m di profondità dato che gli elementi caratterizzanti questo gruppo non sono ampiamenti visibili in nessuno dei tre raggruppamenti. Dal grafico in figura 36 si può osservare come siano cambiati i diversi comparti nel tempo: i punti azzurri rappresentano le repliche e i punti rossi i centroidi, quindi i valori medi delle repliche. Si nota come per ognuno di essi ci sia stato un mutamento, non eccessivo, tra il 2004 e il 2019, questo viene spiegato dalla distanza tra le repliche e tra i centroidi.

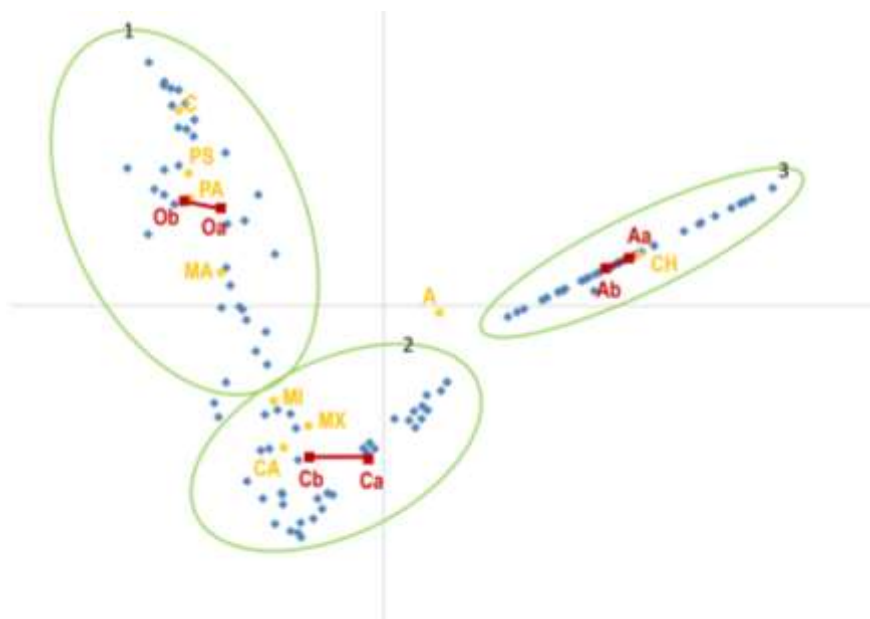


Figura 36: quadrato azzurro: replica; quadrato giallo: gruppo trofico; quadrato rosso: centroide.

## 4.2 Quantitativo di DNA contenuto all'interno dei campioni

A seguito delle analisi svolte in laboratorio, sui campioni prelevati alle Maldive, si sono ottenuti i seguenti quantitativi di DNA espressi in ng/ $\mu$ L. Considerando le tabelle 3,4 e 5: la prima colonna esprime la concentrazione nominale presente in un  $\mu$ L, mentre per la seconda, viene moltiplicata la concentrazione nominale per 200  $\mu$ L in modo da poter rappresentare il DNA totale. Questo procedimento è stato svolto per tutti e tre i casi, quindi sia per i solfobatteri, sia per le matte e sia per il sedimento.

<b>SOLFOBATTERI</b>		
	[DNA] ng/ul	[DNA] ng tot
<b>65B1</b>	2,87	574
<b>65B2</b>	1,11	222
<b>70B1</b>	3,5	700
<b>70B2</b>	3,04	608
<b>75B1</b>	6,14	1228
<b>75B2</b>	10,2	2040

Tabella 3: quantitativo di DNA estratto dai solfobatteri.

<b>MICROBIAL MATS</b>		
	[DNA] ng/ul	[DNA] ng tot
<b>VERDE</b>	0,089	17,80
<b>GIALLA</b>	0,157	31,40
<b>OCRA</b>	0,61	122

Tabella 4: quantitativo di DNA estratto dalle microbial mats.

<b>SEDIMENTO</b>		
	[DNA] ng/ul	[DNA] ng tot
<b>SED</b>	0,16	25,60

Tabella 5: quantitativo di DNA estratto dal sedimento.

Per quanto riguarda le analisi svolte sui filtri (tabella 6), come si può notare dalla tabella sottostante, non hanno riportato un quantitativo sufficiente di DNA per poter continuare le analisi.



FILTRI		
	[DNA] ng/ul	[DNA] ng tot
<b>35A1</b>	0	0
<b>35A2</b>	0	0
<b>50A1</b>	0,019	3,80
<b>50A2</b>	0,00175	0,35
<b>75A1</b>	0	0
<b>75A2</b>	0,031	6,20

*Tabella 6: quantitativo di DNA estratto dai filtri.*

## Discussione

Obiettivo di questo elaborato è stato quello di caratterizzare la comunità macro-bentonica e batterica del Blue Hole delle Maldive e valutare il cambiamento nel tempo della funzione trofica di questo ecosistema dal 2004 al 2019. In un ambiente in continuo mutamento come quello delle scogliere coralline, l'obiettivo era valutare se questo peculiare ecosistema fosse variato in quindici anni com'è stato osservato per l'ambiente circostante. Negli ultimi decenni, a causa dell'aumento globale delle temperature, sono stati osservati diversi fenomeni di bleaching dei coralli ed eventi di mortalità di massa nelle zone tropicali (Baker, Glynn, & Riegl, 2008). Il bleaching è un comportamento degli organismi zooxantellati, come i coralli, che è causato da un aumento anomalo della temperatura dell'acqua e dell'aria (Dijkstra, 2006) dovuto principalmente al fenomeno ENSO (El Niño) (Glynn & De Weerd, 1991; Brown, Saunders, Possingham, & Richardson, 2013). Il bleaching è una risposta dei coralli a questo stress, ovvero i polipi tendono a perdere le zooxantelle (dinoflagellati fotosintetici) e tale evento causa una diminuzione nell'accrescimento del carbonato di calcio (Gates, Baghdasarian, & Muscatine, 1992; Wooldridge, 2017). L'ultimo grande bleaching è avvenuto nel 2016: i coralli morti a causa dell'evento e con il passare del tempo potrebbero essersi spezzati e via via frantumati fino a diventare sedimento, esso potrebbe essere precipitato e fermato lungo le pareti del Blue Hole, come viene descritto anche per le buracas (sinkhole) (Bastos et al., 2013). Quest'ultimo fenomeno potrebbe aver causato l'aumento di sedimento, e quindi di comparto abiotico, che si è potuto osservare lungo le pareti del Blue Hole analizzando i dati fotografici relativi al 2019.



Grazie ai risultati ottenuti dall'analisi relativa al cambiamento nel tempo, è stato possibile osservare un aumento della componente abiotica in particolare roccia nuda e il sedimento. Nel 2019, rispetto al 2004, lungo le pareti del Blue Hole le componenti abiotiche sono aumentate significativamente in particolare alle profondità di 35, 45, 50 e 55 m. A 50 m di profondità, inoltre, è stato possibile osservare una riduzione delle alghe corallinacee incrostanti e un aumento della componente abiotica, in particolare la roccia nuda.

Per quanto riguarda gli altri descrittori non sono state osservate differenze significative tra i due periodi di tempo analizzati. Nel 2019, tuttavia, è stata riscontrata una percentuale di cover dei descrittori biotici sempre maggiore rispetto al 2004 mostrando un lieve impoverimento della biomassa biotica. Le uniche eccezioni sono risultati i descrittori del gruppo trofico dei mixotrofi e per dei macroautotrofi, in questo caso, per alcune profondità, si può notare una maggiore percentuale di cover nel 2019 rispetto al 2004. Tuttavia, tramite l'analisi della struttura della comunità e delle traiettorie di cambiamento tra il 2004 e il 2019 è stato possibile dimostrare una stabilità nelle comunità macro-bentoniche del Blue Hole.

Considerando quindi le analisi svolte si può dedurre che, nonostante un aumento significativo del comparto abiotico e relativa diminuzione del comparto biotico, la comunità bentonica del Blue Hole delle Maldive, ed in particolare la sua funzione trofica, non sia cambiata significativamente dal 2004. Sulla base di questo il Blue Hole può essere definito come un sistema stabile in un contesto globale in continuo cambiamento. Avendo caratterizzato l'ecosistema del Blue Hole da un punto di vista trofico si può notare come i tre comparti studiati lungo la colonna d'acqua non siano cambiati nel tempo e che di conseguenza anche la loro funzionalità non sia cambiata; l'unico comparto che varia maggiormente è il secondo, comprendente proprio mixotrofi e macroautotrofi. Inoltre, osservando anche le temperature raccolte dal 2001 al 2021, si può notare come in vent'anni l'andamento lungo la colonna d'acqua non sia cambiato, fatto salvo per la variazione di un grado negli anni 2001 – 2003 considerato come errore dovuto al diverso strumento che è stato utilizzato.

Tali caratteristiche non sono state riscontrate in nessun'altro Blue Hole fino ad ora studiato. Nonostante la maggior somiglianza con il Blue Hole del Belize, il Blue Hole delle Maldive presenta valori di temperatura atmosferica e della colonna d'acqua differenti e non solo, anche per quanto riguarda cationi e anioni presenti. In generale il Blue Hole delle Maldive

può essere considerato pressoché unico proprio a causa dei differenti valori riscontrati per tutti i fattori che sono stati analizzati rispetto ai Blue Hole nel mondo. La variabilità dei fattori chimico-fisici lungo la colonna d'acqua e la presenza di un chemioclino si riflette nella struttura della comunità presente lungo le pareti del Blue Hole delle Maldive. Ad oggi non sono presenti in letteratura studi relativi alle comunità macro-bentoniche degli altri Blue Hole noti al mondo. Sarebbe interessante poter comparare la comunità macro-bentonica del Blue Hole delle Maldive con quella presente negli altri Blue Hole descritti.

Per quanto riguarda i campioni batterici, i risultati ottenuti tramite le analisi di laboratorio hanno permesso di ottenere un quantitativo di DNA sufficiente alle future analisi genetiche sia per i solfobatteri, sia per le matte batteriche e per il sedimento. Sarà quindi possibile caratterizzare la comunità batterica presente nel Blue Hole.

## **Conclusione**

Gli ecosistemi marini costieri stanno subendo delle variazioni drastiche a causa dei cambiamenti climatici, dell'inquinamento, dell'aumento della temperatura. Queste pressioni sono in continuo aumento e si può ipotizzare che con esse aumenteranno gli impatti negativi sugli ecosistemi. Il Blue Hole delle Maldive può essere considerato un ecosistema pressoché unico, la cui funzionalità trofica è rimasta invariata nel tempo e quindi preservata nonostante la pressione dei cambiamenti globali dovuti all'azione dell'uomo.

Sarà importante in futuro continuare ad indagare questo particolare ambiente con l'obiettivo di conoscerlo sempre più a fondo e di monitorare eventuali cambiamenti nel tempo.

I campioni batterici verranno ulteriormente analizzati al fine di caratterizzare tassonomicamente le comunità microbatteriche del Blue Hole delle Maldive.

## Bibliografia

- Baird, A., & Marshall, P. (2002). Mortality, growth and reproduction in scleractinian corals following bleaching on the Great Barrier Reef. *Marine Ecology Progress Series*, 237, 133–141.
- Baker, A. C., Glynn, P. W., & Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80, 435–471.
- Bastos, Alex C., et al. "Buracas: novel and unusual sinkhole-like features in the Abrolhos Bank." *Continental Shelf Research* 70 (2013): 118-125.
- Becking, L. E., Renema, W., Santodomingo, N. K., Hoeksema, B. W., Tuti, Y., & de Voogd, N. J. (2011). Recently discovered landlocked basins in Indonesia reveal high habitat diversity in anchialine systems. *Hydrobiologia*, 677(1), 89-105.
- Brankovits, D., Pohlman, J. W., Niemann, H., Leigh, M. B., Leewis, M. C., Becker, K. W., et al. (2017). Methane- and dissolved organic carbon-fueled microbial loop supports a tropical subterranean estuary ecosystem. *Nature Communications*, 8, 1835.
- Beddows, P. A., Smart, P. L., Whitaker, F. F., & Smith, S. L. (2007). Decoupled fresh–saline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *Journal of Hydrology*, 346(1-2), 18-32.
- Bishop, R. E., Humphreys, W. F., Cukrov, N., Zic, V., Boxshall, G. A., Cukrov, M., et al. (2015). ‘Anchialine’ redefined as a subterranean estuary in a crevicular or cavernous geological setting. *Journal of Crustacean Biology*, 35(4), 511-514.
- Bottrell, Simon H., et al. "Geochemistry and isotope systematics of sulphur in the mixing zone of Bahamian blue holes." *Applied Geochemistry* 6.1 (1991): 97-103.
- Brown, C. J., Sauders, M. I., Possingham, H. P., & Richardson, A. J. (2013). Managing for interactions between local and global stressors of ecosystems. *PLoS ONE*, 8, e65765.
- Brown, A. L., Reinhardt, E. G., van Hengstum, P. J., & Pilarczyk, J. E. (2014). A coastal Yucatan sinkhole records intense hurricane events. *Journal of Coastal Research*, 30(2), 418-428.

- Canganella F, Bianconi G, Maugeri T (2004) A multiphasic approach to investigate the microbial ecology of a Blue Hole in the Indian Ocean. In: Extremophiles Meeting, 19–23 Sept 2004, Cambridge, USA, p 83.
- Canganella, F., Bianconi, G., Kato, C., & Gonzalez, J. (2007). Microbial ecology of submerged marine caves and holes characterized by high levels of hydrogen sulphide. In *Life in Extreme Environments* (pp. 115-124). Springer, Dordrecht.
- Colantoni P, Baldelli G, Bianchi CN, Capaccioni B, Morri C, Mandrini M, Tassi F (2003) A cave flooded by marine water with hydrogen sulphide highlights the recent evolution of the Maldives (Indian Ocean): preliminary notes. *Le grotte d'Italia* 4: 29–37.
- Collins, S. V., Reinhardt, E. G., Werner, C. L., Le Maillot, C., Devos, F., & Rissolo, D. (2015). Late Holocene mangrove development and onset of sedimentation in the Yax Chen cave system (Ox Bel Ha) Yucatan, Mexico: Implications for using cave sediments as a sea-level indicator. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 438, 124-134.
- Dijkstra, H. A. (2006). The ENSO phenomenon: theory and mechanisms. *Adv. Geosci.* 6, 3–15.
- Dill, R.F., 1977. The blue holes, geologically significant submerged sinkholes and caves off British Honduras and Andros, Bahama Islands. In: *Proceedings of the 3rd International Coral Reef Symposium*, vol. 2, pp. 237–242.
- Dill, R.F.; Land, L.S.; Mack, L.E., and Schwarcz, H.P., 1998. A submerged stalactite from Belize: petrography, geochemistry, and geochronology of massive marine cementation. *Carbonates and Evaporites*, 13, 189–197.
- Gates, R. D., Baghdasarian, G., & Muscatine, L. (1992). Temperature stress causes host-cell detachment in symbiotic cnidarians: Implications for coral bleaching. *Biological Bulletin*, 182, 324–332.
- Gischler, E., 2003. Holocene lagoonal development in isolated carbonate platforms of Belize. *Sedimentary Geology*, 159, 113–132.
- Gischler, E., 2011. Blue Hole. *Encyclopedia of Earth Sciences* pp. 164–165.
- Gischler, Eberhard, Flavio S. Anselmetti, and Eugene A. Shinn. "Seismic stratigraphy of the Blue Hole (Lighthouse Reef, Belize), a late Holocene climate and storm archive." *Marine Geology* 344 (2013): 155-162.

- Glynn, P. W., & De Weerd, W. H. (1991). Elimination of two reef-building hydrocorals following the 1982-83 El Niño warming event. *Science*, 253, 69–71.
- Hammer, Øyvind, David AT Harper, and Paul D. Ryan. "PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis." *Palaeontologia electronica* 4.1 (2001): 9.
- Hatcher, B.G., 2006. Origin of Blue Hole Structures in Coral Reefs: Houtman Abrolhos, Western Australia. *J. Coast. Res.* 22, 202–208.
- van Hengstum, P. J., Scott, D. B., Gröcke, D. R., & Charette, M. A. (2011). Sea level controls sedimentation and environments in coastal caves and sinkholes. *Marine Geology*, 286(1-4), 35-50.
- van Hengstum, P. J., Donnelly, J. P., Fall, P. L., Toomey, M. R., Albury, N. A., & Kakuk, B. (2016). The intertropical convergence zone modulates intense hurricane strikes on the western North Atlantic margin. *Scientific Reports*, 6, 21728.
- van Hengstum, P. J., Cresswell, J. N., Milne, G. A., & Iliffe, T. M. (2019). Development of anchialine cave habitats and karst subterranean estuaries since the last ice age. *Scientific Reports*, 9, 11907.
- van Hengstum, P. J., Winkler, T. S., Tamalavage, A. E., Sullivan, R. M., Little, S. N., MacDonald, D., Donnelly, J. P., & Albury, N. A. (2020). Holocene sedimentation in a blue hole surrounded by carbonate tidal flats in The Bahamas: Autogenic versus allogenic processes. *Marine Geology*, 419, 106051.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., ... Hatziolos, M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318, 1737– 1742.
- Legendre, Pierre. "Model II regression user's guide, R edition." *R Vignette* 14 (1998).
- Marano-Briggs K (2000) Water chemistry, bacterial abundance and anoxygenic photosynthetic bacteria in an estuarine Blue Hole, Andros Island, The Bahamas, Ph.D. Thesis, George Mason University, Fairfax Co., Virginia, USA.
- Martin, J.B., Gulley, J. & Spellman, P. 2012, Tidal pumping of water between Bahamian blue holes, aquifers and the ocean. *Journal of Hydrology*, 416-417: 28-38.

- Myroie, John E., James L. Carew, and Audra I. Moore. "Blue holes: definition and genesis." *Carbonates and Evaporites* 10.2 (1995): 225-233.
- Pohlman, J. W. (2011). The biogeochemistry of anchialine caves: progress and possibilities. *Hydrobiologia*, 677(1), 33-51.
- Purdy, E.G. and Gischler, E., 2003. The Belize margin revisited: 1. Holocene marine facies. *International Journal of Earth Sciences*, 92, 532–551.
- Sampson, Jacqueline, and Ken Guilbeault. "Baseline physicochemical investigations on waters from three blue holes, San Salvador Island, Bahamas." *Studia UBB Geologia* 58.1 (2013): 11-19.
- Sarbu, S. M., Kane, T. C., & Kinkle, B. K. (1996). A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272(5270), 1953-1955.
- Schwabe SJ, Herbert RA (2004) Black Holes of the Bahamas: what they are and why they are black. *Quatern Int* 121:3–11.
- Schwabe, Stephanie, and Rodney A. Herbert. "Black holes of the Bahamas: what they are and why they are black." *Quaternary International* 121.1 (2004): 3-11.
- Sempere-Valverde, Juan, et al. "Taxonomic and morphological descriptors reveal high benthic temporal variability in a Mediterranean marine submerged cave over a decade." *Hydrobiologia* 839.1 (2019): 177-194.
- Seymour, J. R., Humphreys, W. F., & Mitchell, J. G. (2007). Stratification of the microbial community inhabiting an anchialine sinkhole. *Aquatic Microbial Ecology*, 50(1), 11-24.
- Smart PL, Dawans JM, Whitaker F (1988) Carbonate dissolution in a modern mixing zone. *Nature* 335:811–813.
- Smith, D. E., Harrison, S., Firth, C. R., & Jordan, J. T. (2011). The early Holocene sea level rise. *Quaternary Science Reviews*, 30(15-16), 1846-1860.
- Tamalavage, A. E., van Hengstum, P. J., Louchouart, P., Molodtsov, S., Kaiser, K., Donnelly, J. P., Albury, N.A., & Fall, P. L. (2018). Organic matter sources and lateral sedimentation in a Bahamian karst basin (sinkhole) over the late Holocene: Influence of local vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 506, 70-83.
- Wallace, E. J., Donnelly, J. P., van Hengstum, P. J., Wiman, C., Sullivan, R. M., Winkler, T. S., D'Entremont, N., & Albury, N. (2019). Intense hurricane activity over the past 1500

years at South Andros Island, The Bahamas. *Paleoceanography and Paleoclimatology*, 34, 1761-1783.

Whitaker, F. F., & Smart, P. L. (1997). Groundwater circulation and geochemistry of a karstified bank-marginal fracture system, south Andros Island, Bahamas. *Journal of Hydrology*, 197 (1-4), 293-315.

Wooldridge, S. A. (2017). Instability and breakdown of the coral-algae symbiosis upon exceedence of the interglacial pCO<sub>2</sub> threshold (>260 ppmv): The “missing” Earth-System feedback mechanism. *Coral Reefs*, 36(4), 1025–1037.

Xie, Linping, et al. "Hydrochemical properties and chemocline of the Sansha Yongle blue hole in the South China Sea." *Science of the Total Environment* 649 (2019): 1281-1292.

## Ringraziamenti

Innanzitutto, vorrei ringraziare la persona che mi ha consentito di svolgere la tesi più bella che potessi sperare: la Prof.ssa Monica Montefalcone. Grazie per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso ed inserirmi in un bellissimo progetto, è stata un'esperienza unica che non dimenticherò mai, dal primo giorno, alla Crociera alle Maldive fino alla scrittura della tesi. Non vedo l'ora di sapere come andrà avanti questo progetto. Grazie anche per aver avuto sempre parole gentili e di sostegno, non è da tutti trasmettere l'amore per il proprio mestiere, lei ci è riuscita.

Grazie alla Dott.ssa Annalisa Azzola, chiamata da me "la mia dottoranda di fiducia". Oltre ad avermi affiancata tutto il tempo è sempre stata disponibile e gentile, ha risposto ad ogni mia domanda, ogni mio problema e ha ripetuto centinaia di volte concetti che non ho compreso alla prima spiegazione. Grazie per avermi aiutata, sostenuta e soprattutto grazie per avermi fatto ancora di più capire quanto fosse bella questa esperienza, per avermela fatta vivere serenamente e in completezza, per avermi consigliato e guidato nel mio cammino di laurea.

Ai miei genitori, fulcro portante della mia vita, miei sostenitori più accaniti. Grazie per avermi sopportata e supportata non solo in questi due anni ma da tutta la vita, per avermi concesso di studiare ciò che mi piaceva senza giudicarmi mai, di avermi permesso di fare tantissime esperienze e per amarmi incondizionatamente dal primo giorno. Vi voglio bene più dell'universo intero, lo sapete, ve lo ripeto spesso anche se non sempre, sappiate che la mia vita non è nulla senza di voi, ora e sempre.

A mia sorella, la mia compagna di vita noiosa e bisbetica che mi porto appresso da tempo immemore. Grazie per avermi voluta accanto e per aver spinto mamma e papà ad avere una sorellina. Sicuramente se non fosse per te a quest'ora magari me ne starei nell'universo serena a fluttuare chissà dove ma non avrei mai potuto cantare *Disturbia* con te. Spero che le nostre vite non si separino mai dall'intreccio che le lega, sono troppo fortunata ad averti come sorella. Sei l'altra parte del mio cuore.

A Giuli, amica di casa, merende, risate, pianti e riflessioni. L'amica con cui potrei passare 24 ore su 24 che non sarebbero mai abbastanza per parlare di tutto il parlabile. Grazie Zi perché mi hai tirato su tante di quelle volte che ormai ho perso il conto, grazie perché sei sempre vicina a me anche se sei lontana, perché ci divertiamo e perché non mi hai mai lasciata sola. Potrei fare un papiro ma so che sai quanto per me sei stata e sei importante.



Ad Ale, amica d'infanzia e di pianti. La mia gemella mancata. Grazie per essere un'amica disponibile e per capirmi completamente, alla fine abbiamo lo stesso carattere e gli stessi pensieri. I tuoi abbracci sono la cosa che più mi ricorda casa e che mi mancano ogni volta che sono triste e so che sei lontana, stare con te è come essere a Garbaoli, sa di libertà.

A Miri, amica del cuore. Grazie per essere l'amica di sempre anche se un po' troppo pigra. Sei il mio opposto e forse proprio per questo ci completiamo, alla fine a 13 anni non eravamo così stupide se ci siamo definite come lo Ying e Yan. Ovunque andremo ci sarà sempre un po' di te in me e spero che per te sia lo stesso.

A Fede e Marta, compagne di università triennale e amiche care. Grazie per avermi voluta nella vostra vita anche dopo che le nostre strade si sono divise. Non sapete quante volte abbia pensato a voi nella preparazione degli esami, a lezione, a casa, in treno e via dicendo. Mi siete mancate tantissimo, soprattutto mi è mancato vivere questa esperienza con voi.

A Martina, compagna di quest'avventura, ma purtroppo solo per poco. Ci siamo conosciute nel momento in cui siamo diventate compagne di stanza alle Maldive e ringrazio il cielo di esserti stata simpatica sennò a quest'ora chissà che fine avrei fatto! Grazie Marti, conoscerti è stata una delle cose più belle che mi sono capitate quest'anno, ho scoperto in te un'amica sincera e considera che ogni volta in cui siamo insieme mi fanno male gli angoli della bocca da quanto mi riesco a divertire. A noi e alla nostra voglia di far diventare tutto questo, un giorno, un lavoro.

A tutti i miei amici, amici fino ad oggi e spero per molto tempo ancora. Grazie per avermi sopportato, chi ogni giorno e chi solo per qualche volta al mese. Non ci vediamo/sentiamo sempre ma per me siete la mia seconda famiglia, di quelle allargate al massimo dove ognuno di voi, con i diversi caratteri, occupa un tassello insostituibile nel mio cuore.

A tutti voi: grazie! Vi dedico parte di questo traguardo, ve lo meritate molto, sono la persona più lunatica, emotiva e pesante al mondo, ma per voi darei la Luna. Vi voglio bene.

*Auri*