

Effetti dell'H₂S sul contenuto di elementi in tracce nel lichene epifita *Parmelia sulcata*

MAURO TRETACH (*), FABRIZIO MONACI (**),
LAURENCE BARUFFO (*) e ROBERTO BARGAGLI (**)

RIASSUNTO. Mediante tecniche spettrofotometriche sono stati studiati gli effetti dell'idrogeno solforato (H₂S) sul contenuto elementare di Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, S e Zn nel lichene epifita *Parmelia sulcata*. I campioni sono stati raccolti su *Castanea sativa* in due zone (A e C), poste rispettivamente a 16-30 m e a più di 130 m in direzione SE da una fonte naturale presso Abbadia S. Salvatore (Toscana), già oggetto di precedenti studi a carattere floristico-vegetazionale.

I dati ottenuti con la digestione totale di un miscuglio di 42 talli raccolti in ciascuna zona dimostrano che i talli della zona A hanno un contenuto totale più elevato di S e Hg (emessi dalla fonte inquinante) e di Al e Fe (di probabile origine terrigena), e un minor contenuto di Ca e Mg.

La tecnica dei lavaggi sequenziali, se completata da una digestione totale del residuo, si è dimostrata particolarmente efficace per verificare la localizzazione intra- ed extracellulare di metalli in tracce. I risultati confermano i dati di precedenti studi secondo cui nei licheni tanto il Ca quanto il Mg sono distribuiti prevalentemente a livello di pareti cellulari, mentre il K e il Na sono elementi prevalentemente intracellulari. Al, Fe e Hg sono presenti soprattutto sotto forma particellare (anche se il Fe sembra essere più disponibile per i talli della zona A), mentre lo S è presente tanto a livello citoplasmatico (probabilmente sotto forma di glutatione) quanto sotto forma di particellato. È stata inoltre dimostrata la presenza di anomalie nella distribuzione dei metalli nei talli della zona A rispetto ai valori di riferimento misurati nei talli della zona C. Il Ca ed il Mg hanno concentrazioni molto inferiori nei distretti extracellulari. Ciò è dovuto non a differenze di accumulo di particellato o di cristalli (l'ossalato di Ca è assente in entrambi i gruppi di campioni) bensì alla parziale sostituzione di questi cationi da parte degli idrogenioni, a causa dell'azione acidificante dell'H₂S sulle cortecce della zona A. La riduzione della frazione esterna del Ca comporta una riduzione di quella citoplasmatica, che forse è tale da indurre delle disfunzioni metaboliche.

I risultati di questo studio sembrano indicare che gli effetti dell'H₂S alle concentrazioni presenti nella zona A (valore medio massimo < 2 ppm) sono prevalentemente di tipo indiretto, in quanto vengono modificate le caratteristiche chimico-fisiche del substrato con conseguente squilibrio nel contenuto citoplasmatico di alcuni elementi (essenzialmente Ca e Fe), mentre le membrane biologiche mantengono integre le proprie funzioni.

EFFECTS OF H₂S ON THE CONTENT OF TRACE ELEMENTS IN THE EPIPHYTIC LICHEN *PARMELIA SULCATA*

SUMMARY. The effects of hydrogen sulphite (H₂S) on the content of selected trace elements (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, S e Zn) in the epiphytic lichen *Parmelia sulcata* were studied by spectrophotometric techniques. The samples were collected on *Castanea sativa* in two areas (A e C), at 16-30 m and at more than

(*) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Trieste, Via Giorgieri 10 - 34127 Trieste, Italia.

(**) Dipartimento di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Siena, Via delle Cerchia 3 - 53100 Siena, Italia.

130 m from a natural vent near Abbadia S. Salvatore (Toscana, Central Italy), where the pollutant has a maximum concentration of c. 2 ppm, and 5 ppb, respectively.

The data obtained by total digestion of a mixture of 42 thalli collected in each area show that thalli from area A have higher contents of S and Hg (emitted by the vent), Al and Fe (probably of soil origin), and lower contents of Ca and Mg.

The data obtained using a protocol of sequential elutions with NiCl_2 , followed by total digestion of the remnants, confirm that Ca and Mg mainly belong to the ion exchange site fraction, whereas K and Na are mainly intracellular. Al, Fe and Hg are mainly present as particulate (although Fe seems to be more available for thalli «A»), whereas S is present in the cytoplasm in organic form (probably mainly as glutathione) as well as within intercellular spaces in inorganic form, as particulate. The two sets of samples showed some important differences also in the compartmentalization of the elements. For instance, in area A the quantity of Ca and Mg bound to the cell walls is considerably lower than in area C; this is caused not by differences in dust contamination or in crystal accumulation (Ca oxalate is absent in both groups of samples), but to ion leakage caused by the higher H^+ concentration of the barks of area A, derived from the H_2S hydrolysis. Such a reduction is reflected by a dramatic decrease in the intracellular fraction, which might be harmful for the lichen.

The results suggest that the effects of the exposure to low levels of H_2S on the elemental content of *P. sulcata* are mainly indirect, being due to the modification of the chemico-physical characteristics of the substratum, whereas cell membranes seem to maintain their integrity.

Introduzione

Il solfuro d'idrogeno (H_2S) è il principale composto dello zolfo allo stato ridotto presente nell'atmosfera (Brown e Bell, 1986; Sawyer *et al.*, 1994). Esso deriva prevalentemente da fenomeni naturali, sia di origine biotica che abiotica, tra cui particolarmente importanti sono le attività vulcaniche (Shooter *et al.*, 1995). Negli ultimi decenni a queste fonti si sono aggiunte quelle industriali (soprattutto legate alla produzione di cellulosa) e quelle legate allo sfruttamento della geotermia, che recentemente ha conosciuto un notevole sviluppo anche nel nostro Paese. Le centrali geotermoelettriche permettono di ottenere, tramite lo sfruttamento diretto del calore del suolo, energia alternativa definita come «pulita». In realtà esse provocano l'immissione nell'atmosfera di diversi elementi tra cui mercurio, boro e arsenico (Bargagli e Barghigiani, 1991; Connor, 1979; Koranda, 1980; Loppi e Bargagli, 1996; Matthews, 1981), oltre a notevoli quantità di H_2S : piccole centrali di 20 mWe l'anno possono ad esempio rilasciarne fino a 1.200 tonnellate all'anno (Dall'Aglio, 1988). Questa emissione ha ovviamente un notevole impatto ambientale che deve essere controllato e monitorato a causa della tossicità del solfuro d'idrogeno, che è almeno parzialmente legata alla sua elevata reattività con metalli e sali metallici (Leithe, 1971).

Nonostante il fatto che i licheni siano degli ottimi indicatori ambientali, essi sono stati utilizzati in modo del tutto saltuario nel monitoraggio dell'inquinamento da H_2S , in quanto finora mancavano studi specifici che dimostrassero in maniera univoca una relazione causale tra la rarefazione dei licheni e la concentrazione di questo inquinante. Loppi (1996) in un recente studio ha utilizzato i licheni per monitorare le aree geotermali di Travale-Radicondoli, in Toscana; in un'area di 15 km², disposta attorno alle centrali termoelettriche, è stata evidenziata una forte variazione dello IAP (Index of Air Purity), attribuita proprio alle emissioni geotermali. Questo autore, però, ha supposto che la rarefazione dei licheni sia dovuta solo indirettamente all' H_2S , in quanto questo gas nell'aria

si ossida facilmente a SO_2 (Perry *et al.*, 1976; Unsworth *et al.*, 1985), un composto particolarmente dannoso per i licheni (Ferry *et al.*, 1973; Nash e Gries, 1991; Seaward, 1993). Più recentemente, le modificazioni indotte dalla presenza di basse concentrazioni di H_2S sulla vegetazione lichenica epifita sono state indagate da Tretiach e Ganis (1999), che hanno studiato la biodiversità lichenica su 18 castagni posti lungo un transetto a partire da una sorgente di H_2S presso Acquapassante (M. Amiata, Toscana meridionale). Questi autori hanno dimostrato che gli alberi più prossimi alla sorgente inquinante hanno valori di biodiversità notevolmente inferiori a quelli misurati sugli alberi più distanti, a causa della progressiva rarefazione delle specie che caratterizzano la comunità lichenica epifita della zona non inquinata. Purtroppo, i possibili meccanismi di azione dell' H_2S a livello fisiologico sono ancora scarsamente conosciuti. Ad Acquapassante è stata quindi intrapresa una ricerca multidisciplinare sugli effetti dell' H_2S sul metabolismo del lichene foglioso *Parmelia sulcata* Taylor, che è l'unica specie presente con buoni valori di copertura sugli alberi più prossimi alla sorgente che emette H_2S , anche se la sua biomassa diminuisce progressivamente avvicinandosi alla sorgente (Tretiach e Ganis 1999), mostrando segni di sofferenza e di ridotta vitalità.

Molti gas fitotossici, ad esempio l' SO_2 e i fluoruri, sono in grado di determinare seri danni a livello delle membrane cellulari, causando forti squilibri nella distribuzione dei macro- e micronutrienti tra spazi interifali, pareti delle ife, e citoplasma (LeBlanc *et al.*, 1971; Puckett *et al.*, 1974; Malholtra e Hocking, 1976; Tomassini *et al.*, 1977; Pakarinen, 1985). Con il presente studio si è voluto pertanto verificare se anche l' H_2S è in grado di indurre danni alle membrane. Nel settembre 1997 sono state quindi effettuate delle misurazioni preliminari di bioaccumulo tanto in talli di *P. sulcata* quanto del substrato su cui essi crescevano, mediante la tecnica della digestione totale, ampiamente utilizzata in studi sul bioaccumulo nei licheni (Matthews, 1981; Bargagli *et al.*, 1987; Bargagli, 1989; Connor, 1979; Nimis *et al.*, 1989; Nimis *et al.*, 1992; Castello *et al.*, 1994). Con tale tecnica non è possibile però conoscere l'aliquota effettivamente disponibile per il metabolismo dell'organismo. Il contributo di ogni metallo nel valore di bioaccumulo totale può infatti essere suddiviso in diverse frazioni, a seconda della diversa localizzazione nel tallo (Nieboer *et al.*, 1978; Buck e Brown, 1979; Brown e Beckett, 1985). Una frazione cospicua si accumula ad esempio all'esterno del tallo sotto forma di polveri, oppure negli spazi intercellulari sotto forma di particellato insolubile (Nieboer *et al.*, 1978; Garty *et al.*, 1979; Brown, 1987; Purvis e Halls, 1996; McLean *et al.*, 1998). Una seconda frazione, che si potrebbe definire come «biotica», è invece presente nelle ife e nelle cellule del fotobionte; in questo caso essa può essere localizzata in tre diversi compartimenti: a livello della parete cellulare, nelle membrane cellulari, oppure nel citoplasma (Nieboer *et al.*, 1978). A differenza della frazione insolubile, quella biotica influenza direttamente il metabolismo dell'organismo. L'acquisizione di cationi negli spazi intra- ed extracellulari riguarda processi fisiologici completamente diversi, in quanto l'adsorbimento di questi metalli sulla parete cellulare è un fenomeno passivo di natura chimico-fisica, mentre l'assunzione all'interno della cellula è un processo controllato biologicamente (Farrar, 1976; Nieboer *et al.*, 1978; Nieboer e Richardson, 1981; Richardson *et al.*, 1984).

Per studiare la localizzazione intra- ed extracellulare degli elementi può essere convenientemente utilizzata la tecnica dei lavaggi sequenziali proposta da Brown e Wells (1988), secondo le modifiche di Brown e Brown (1991). Questa tecnica si basa sul principio della sostituzione dei cationi già presenti all'interno del lichene da parte del Ni^{++} , fornito a concentrazioni tali da non interferire con il funzionamento delle membrane. Tramite dei lavaggi in acqua distillata viene dapprima asportata la porzione di cationi extracellulari non legati alle membrane e alle pareti cellulari, costituita ad esempio da polveri, mentre con i lavaggi in soluzioni di NiCl_2 a freddo si utilizza la maggior affinità degli ioni Ni^{++} per i siti di legame delle pareti e delle membrane cellulari che si sostituiscono agli altri cationi già presenti; tramite una successiva bollitura, che determina la rottura delle membrane cellulari, gli ioni Ni^{++} di una nuova soluzione possono legarsi anche ai siti all'interno delle cellule, determinando il rilascio in soluzione della porzione di cationi solubili intracellulari.

Nel caso in cui siano presenti dei danneggiamenti a livello delle membrane cellulari, è possibile osservare delle evidenti anomalie nella distribuzione tra i diversi compartimenti di alcuni elementi monovalenti, che normalmente sono presenti prevalentemente a livello citoplasmatico (Buck e Brown, 1979; Brown e Brown, 1991). Infatti, a causa dell'inefficiente funzionamento dei meccanismi di regolazione osmotica, ciò implica una perdita molto elevata di cationi dal compartimento citoplasmatico che si traduce in un aumento a livello delle pareti (Brown e Brown, 1991).

Nel presente studio è stata condotta anche una ulteriore serie di misure per cercare di spiegare su base sperimentale le anomalie nei valori di concentrazione di cationi bivalenti a livello di parete osservate nei campioni di *P. sulcata* raccolti in prossimità della sorgente inquinante, che potevano correlarsi ai più bassi valori di pH del loro substrato.

Area di campionamento

Il campionamento è stato condotto sul versante est del M. Amiata, in località Acquapassante (Abbadia S. Salvatore, Toscana), a 1052 m s.l.m. presso un camino alto 5.2 m che emette vapore acqueo, solfuro d'idrogeno e anidride carbonica da una sorgente naturale (Tretiach e Ganis, 1999) situata all'interno di un castagneto disetaneo. I talli sono stati raccolti su alberi di c. 60 anni di età in due zone (qui di seguito indicate con le lettere A e C, vedi anche Fig. 1 di Tretiach e Ganis, 1999), poste rispettivamente a 16-30 m e a più di 130 m in direzione SE dalla fonte inquinante.

Una descrizione dettagliata del sito, del suo clima e della vegetazione lichenica epifita è riportata in Tretiach e Ganis (1999).

Misure all'uscita del camino effettuate dall'Unità Misure e Laboratorio dell'ENEL di Pisa hanno dimostrato che l' H_2S ha una concentrazione superiore a 100 ppm (non 1.400 ppm, come riportato da Tretiach e Ganis, 1999), mentre è assente l' SO_2 , un gas i cui effetti tossici sui licheni sono ben noti (Richardson e Nieboer, 1981; Modenesi, 1993; Nieboer *et al.*, 1979). Nelle emissioni gassose è presente anche Hg in fase gassosa; a 2 m dal terreno e a 5 m dal camino la concentrazione è stata da noi stimata in $27.4 \pm 9.4 \text{ ng/m}^3$.

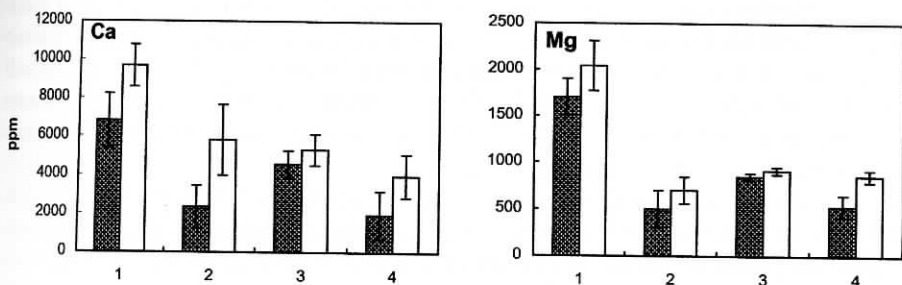


Fig. 1 - Valori medi del contenuto totale di Ca e Mg (ppm) misurati in talli di *Parmelia sulcata* raccolti nelle zone A (■) e C (□) dell'area di studio nel maggio 1998 (1, $n = 20$), settembre 1997 (2, $n = 84$), giugno 1997 (3, $n = 5$), e maggio 1992 (4, $n = 9$).

La specie

Per il presente studio sono stati utilizzati talli (o loro porzioni) del lichene epifita *Parmelia sulcata*, che è forse la più comune specie di questo genere in Italia, diffusa dalla fascia planiziale a quella subalpina (Nimis, 1993), e presente in molte comunità licheniche, soprattutto su alberi a scorza da neutra a fortemente acida (Wirth, 1980). *Parmelia sulcata* ha una buona tolleranza agli inquinanti atmosferici, scomparendo ad esempio solo in zone con concentrazioni di SO_2 maggiori di $90 \mu\text{g m}^{-3}$ (Seaward e Hitch, 1982), e può quindi essere presente anche all'interno di insediamenti urbani, specialmente in aree con clima umido (Nimis, 1986; Nimis *et al.*, 1991a; Nimis *et al.*, 1991b; Nimis *et al.*, 1992; Nimis *et al.*, 1994; Castello *et al.*, 1994). Questa specie contiene acido salazinic e consalazinic, atranorina e cloroatranorina (Galloway e Elix, 1983); Dey (1978) riporta anche la presenza di acido lobarico in specie provenienti dalle montagne Appalchiane (Stati Uniti orientali).

Dati e Metodi

Misure preliminari di bioaccumulo

Per queste misure sono stati utilizzati 42 talli raccolti con un temperino in acciaio inossidabile dai 4 alberi di ciascuna zona più prossimi alla sorgente inquinante, ad una altezza di 0.8-2 m dal suolo. I campioni di corteccia, dello spessore di *c.* 1 mm, sono stati raccolti da quattro alberi di *Castanea*, due per zona, a circa 1.5 m dal suolo. I talli e le cortecce, dopo una attenta pulitura allo stereomicroscopio per rimuovere materiale estraneo e parti morte, sono stati polverizzati con un mulinello Dangoumau raffreddato ad acqua per circa 10 min, e lasciati nel contenitore chiuso per circa 5 min per permettere il deposito della polvere. Dal materiale ottenuto sono state prelevate aliquote di *c.* 130-150

mg, che sono stati mineralizzati in contenitori di Teflon sotto pressione a 120°C per 8 ore mediante HNO₃ concentrato, con una prova in bianco. Altre aliquote di materiale sono state utilizzate per le aggiunte interne: in 4 contenitori è stata posta la stessa quantità di campione e in 3 di essi, prima della digestione, sono state aggiunte concentrazioni note crescenti degli elementi da determinare. Dopo la digestione ciascun campione veniva portato a un volume di 10 ml con acqua distillata.

Le concentrazioni degli elementi sono state determinate mediante tecniche spettrofotometriche. Per la determinazione di Ca, Cu, B, Ba, K, Mg, Mn, Na, e Zn è stato utilizzato uno spettrofotometro di assorbimento atomico (mod. 2280, Perkin Elmer) con sistema di atomizzazione in fiamma aria/acetilene. Le analisi di Al, Fe, Hg e S invece sono state effettuate mediante spettrofotometro di emissione atomica (mod. PLASMA 400, Perkin Elmer), facendo passare per il sistema ottico un flusso di azoto per eliminare possibili interferenze dovute all'ossigeno atmosferico. Prima di iniziare le analisi il flusso è stato mantenuto a c. 30 l min⁻¹ per 30 min, mentre durante le analisi è stato ridotto a c. 15 l min⁻¹.

Localizzazione intra- ed extracellulare di cationi

Nel marzo 1998 in ciascuna zona sono stati raccolti 10 talli di *Parmelia sulcata* di c. 6 cm di diametro a 0.8-2 m dal suolo. Dopo l'accurata pulitura, da ogni tallo è stata prelevata una porzione di c. 50 mg in peso secco per i lavaggi sequenziali e una porzione di c. 130 mg in peso secco per la digestione totale, che è stata effettuata come descritto nel capitolo precedente, al fine di conoscere il contenuto totale degli elementi prima della serie dei lavaggi. Ogni campione è stato successivamente riposto per 24 h in una petri chiusa contenente all'interno dell'ovatta bagnata per reidratare i campioni, e ristabilire così l'integrità delle membrane.

La tecnica dei lavaggi sequenziali (Brown e Brown, 1991) prevede per ogni campione due lavaggi di 30 min ciascuno in 10 ml di acqua distillata. Seguono due lavaggi, il primo di 40 min ed il secondo di 30 min, in 10 ml di una soluzione di NiCl₂ 20 mM. I singoli campioni vengono quindi prima posti su una rete sottile di nylon e lavati con acqua distillata a caduta e poi messi in stufa a 40°C per 36 h per poter determinare il loro peso secco (temperature più elevate causerebbero la volatizzazione del Hg). Successivamente, per rompere le membrane cellulari, i campioni vengono immersi per altre due volte in 10 ml di soluzione di NiCl₂ 20 mM in provette chiuse di PVC immerse in un bagno maria a bollire. I campioni vengono quindi immersi in 10 ml di una soluzione di HNO₃ 1 M, lavati con acqua distillata e introdotti in stufa a 40°C per 36 h per ottenere il peso secco delle pareti cellulari. Per verificare la presenza di particolato insolubile in HNO₃ i residui dei campioni sono stati digeriti secondo le modalità esposte sopra. In tutti i passaggi i campioni vengono agitati in soluzioni contenute in provette di PVC chiuse con un tappo a vite poste su una tavoletta basculante, estratti con pinzette e asciugati con attenzione su carta Whatman per assorbire eventuali gocce di soluzione rimaste sulla loro superficie prima di immergerli nella soluzione di eluizione successiva. Prima di effettuare le misure

tutte le soluzioni sono state lasciate decantare. Le concentrazioni sono state misurate con la strumentazione sopra citata. A causa dell'elevato numero di soluzioni di lavaggio necessarie (9) e del numero di campioni considerati (20), le analisi sono state limitate agli elementi più interessanti da un punto di vista fisiologico-funzionale (Ca, K, Mg e Na) e a quelli che mostravano delle forti variazioni in base alle digestioni totali effettuate in precedenza (Al, Fe, Hg, S). Va sottolineato che i dati relativi allo S e al Hg sono puramente indicativi. Infatti il Hg ha un'affinità per i siti di legame più elevata del Ni, che non è in grado quindi di provocarne la rimozione per sostituzione, mentre lo S è un elemento che può essere presente in un elevato numero di stati di ossidazione, essendo legato a composti organici molto diversi, per cui ad esempio i valori determinati nelle soluzioni di lavaggio di NiCl₂ a bollitura dovrebbero essere costituiti prevalentemente da molecole idrosolubili. La quantificazione delle frazioni di questi due elementi dovrebbe essere quindi effettuata utilizzando altre metodiche.

Lavaggi dei campioni di *Parmelia sulcata* a pH diversi

L'eventuale influenza del pH delle scorze sulla concentrazione degli elementi legati a livello di parete è stata verificata sottoponendo campioni raccolti nella zona C a blandi lavaggi in due soluzioni di HCl a pH 3.5 e 5.0, pari cioè ai valori misurati nelle scorze degli alberi alle estremità delle zone A e C (Tretiach e Ganis, 1999). Sei talli di *P. sulcata* di dimensioni simili sono stati raccolti nel settembre 1997 e accuratamente puliti allo stereomicroscopio. Da ciascun tallo sono stati prelevati tre frammenti di c. 50 mg ciascuno. I gruppi di campioni sono stati reidratati ponendoli per una notte in petri chiuse contenenti ovatta umida. Il giorno seguente i campioni di due gruppi sono stati posti per 30 min in provette di vetro di 20 ml contenenti 10 ml di una delle due soluzioni diluite di HCl su una tavoletta basculante, quindi sono stati estratti, posti su un setaccio di nylon, lavati con acqua distillata a caduta, e ne è stato misurato il peso secco a 80°C. Il terzo gruppo di campioni è stato solamente lavato con acqua distillata a caduta, e quindi seccato. Tutti i tre gruppi di campioni sono stati quindi digeriti in bomba, e ne è stato determinato il contenuto in Ca, K, Mg e Na secondo le tecniche sopra citate. Il contenuto di questi stessi elementi è stato misurato anche nei 12 campioni di soluzioni di HCl, di cui è stato misurato il pH con un pHmetro di precisione.

Analisi statistiche

Tutti i dati ed i grafici sono stati elaborati con il foglio di lavoro Excel (Microsoft) e con il programma STATISTICA (Statsoft, Inc. 1995).

La matrice delle concentrazioni dei metalli nelle soluzioni dei lavaggi sequenziali espresse in percentuale rispetto al loro totale è stata sottoposta a processo di classificazione mediante il programma MULVA-4 (Wildi e Orlóci, 1983) utilizzando la distanza euclidea come misura di somiglianza e come algoritmo di clustering la minima varianza.

Risultati e discussione

Valori del contenuto totale di elementi in tracce

Le concentrazioni dei dodici metalli nei talli di *P. sulcata* raccolti nelle zone A e C nel settembre 1997 sono riportate in Tab. 1. In base alle differenze tra le due zone si possono individuare tre gruppi principali di elementi, in quanto S, Hg, Fe, Al sono più concentrati nei talli raccolti in prossimità della sorgente, Ca e Mg sono più concentrati nei talli raccolti lontano dalla sorgente, mentre Na, K, Cu, Zn, Mn e Ba non mostrano alcuna differenza significativa tra le due zone. Gli elementi del primo gruppo sono evidentemente eterogenei per quanto riguarda la loro origine, in quanto S e Hg sono emessi dalla sorgente inquinante sotto forma gassosa (anche se in concentrazioni ovviamente molto diverse), mentre Fe e Al hanno una probabile comune origine terrigena. Il Hg potrebbe essere considerato quale tracciante delle emissioni della sorgente, se non venisse emesso in parte anche dal suolo, che nell'area di studio è particolarmente ricco in minerali di cinabro. Non è perciò sorprendente che la concentrazione di Hg nei talli della zona C sia particolarmente elevata in confronto ai valori riscontrati in altre zone italiane, magari interessate da attività industriali, mentre è simile ai valori di background stimati per l'area amiatina da Bargagli *et al.* (1987). Nel nostro caso la notevole differenza nel contenuto di Al e Fe potrebbe essere attribuita a un maggior apporto di particellati nella zona A, che non a caso è più aperta e parzialmente disturbata, a causa della presenza di una strada con scarso traffico. Le differenze nei valori di concentrazione degli elementi del secondo gruppo (Ca e Mg), che sono nettamente più elevati nella zona C, sono sostanziate dal confronto con dati inediti relativi ad altri tre campionamenti effettuati nelle due zone in anni diversi, sebbene in periodi diversi dell'anno (Fig. 1). Anche in questo caso tanto il Ca quanto il Mg sono sempre meno concentrati nei talli più prossimi alla sorgente inquinante. La concentrazione di questi ioni bivalenti è molto variabile: nel caso del Ca infatti si passa da un valore minimo medio di 1932 ppm ad uno massimo di 9680 ppm, mentre nel caso del Mg si va da 500 ppm a 2040 ppm, con un fattore moltiplicativo di c. 4 in entrambi i casi.

Tab. 1

Lichen	Al	Fe	S	Hg	Cu	Ba
A	2987 ± 161	1832 ± 71	2400 ± 43	0.82 ± 0.006	11.1 ± 0.8	35.6 ± 0.2
C	2059 ± 111	1280 ± 50	1600 ± 29	0.34 ± 0.002	10.2 ± 0.7	35.2 ± 0.2
Lichen	Mg	Ca	Na	K	Mn	Zn
A	845 ± 20	4600 ± 180	90 ± 3	4372 ± 22	70.2 ± 0.7	53.1 ± 0.6
C	911 ± 22	5300 ± 207	82 ± 3	4429 ± 22	77.7 ± 0.8	52.9 ± 0.6

Contenuto totale di Al, Fe, S, Hg, Cu, Ba, Mg, Ca, Na, K, Mn e Zn (ppm) nei talli di *Parmelia sulcata*, raccolti nelle zone A e C dell'area di studio.

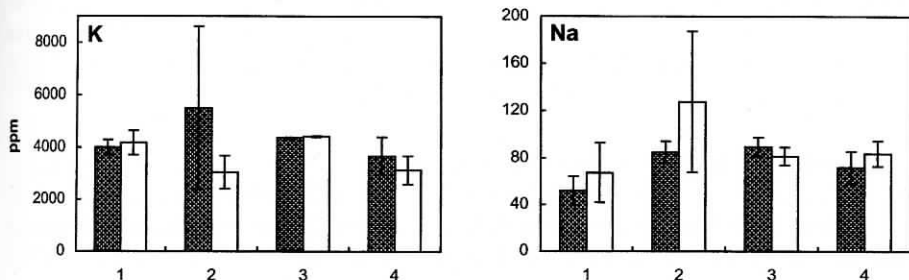


Fig. 2 - Valori medi del contenuto totale di K e Na (ppm) misurati in talli di *Parmelia sulcata* raccolti nelle zone A (■) e C (□) dell'area di studio nel maggio 1998 (1, $n = 20$), settembre 1997 (2, $n = 84$), giugno 1997 (3, $n = 5$), e maggio 1992 (4, $n = 9$).

I valori delle concentrazioni di Cu, Zn, Mn e Ba non permettono di evidenziare alcuna differenza significativa tra le due zone; in genere essi rientrano nell'ambito del normale intervallo di concentrazione misurato in materiali vegetali (Flocchia *et al.*, 1985), per cui non sono stati analizzati nelle successive serie di misure per la localizzazione intra- ed extracellulare degli ioni. Anche Na e K non differiscono sostanzialmente tra le due zone (Tab. 1), tuttavia essi non sono stati tralasciati nelle successive misure dei lavaggi sequenziali, a causa della loro notevole importanza a livello fisiologico, e in quanto una distribuzione anomala tra i diversi compartimenti cellulari può essere interpretata come un'indicazione di danni a livello di membrana (Brown e Brown, 1991). Va sottolineato che entrambi questi elementi non hanno manifestato differenze significative tra le due zone anche negli altri tre campionamenti effettuati in periodi diversi dell'anno (Fig. 2), anche se la variazione tra un campionamento e l'altro è stata certamente più contenuta di quella del Ca e del Mg, con un fattore moltiplicativo di *c.* 2 tra valori minimi e massimi.

Le concentrazioni dei metalli in tracce nella corteccia di *Castanea* delle zone A e C sono riportate in Tab. 2. I dati confermano sostanzialmente quanto illustrato precedentemente: Hg e S hanno infatti concentrazioni più elevate nella zona A (rispettivamente 4.7 ppm contro 2.06 ppm e 0.17% contro 0.125%), mentre Ca e Mg hanno valori più elevati nella zona C (rispettivamente 2.1% contro 1.24% e 0.1% contro 0.045%). Questi ultimi dati sono particolarmente interessanti se si considera che nella zona A (come discusso in precedenza) ci dovrebbe essere un maggior apporto terrigeno, e quindi le cortecce degli alberi della zona A dovrebbero essere più ricche in Ca in quanto questo elemento è presente nei suoli del M. Amiata con valori dell' 1.1-1.2% (Bargagli *et al.*, 1987). Il rapporto tra i valori misurati nei licheni (Tab. 1) e nelle cortecce (Tab. 2) viene riportato in Tab. 3. Ci sono delle differenze significative nella capacità di bioaccumulo dei diversi metalli, in quanto ad esempio Hg, Ca, Cu, e Mn sono molto più concentrati nelle cortecce (valori < 1), mentre al contrario K, S e Zn sono molto più concentrati nel lichene (valori > 1). I valori dell'Al e del Fe, confermando i risultati di Bargagli (1990), sono solo leggermente

più elevati nelle cortecce nella zona di controllo, ma in A sono più concentrati nei licheni, forse in seguito al maggior dilavamento dei due elementi dalle cortecce a causa dell'aumento dell'acidità (cf. Bates e Brown, 1981), indotto dalla presenza del H_2S .

Localizzazione intra- ed extracellulare di cationi

I risultati delle analisi sulle soluzioni di lavaggio dei 20 campioni di *Parmelia sulcata* sono riportati nella parte superiore di Tab. 4. I valori corrispondono alla somma delle medie relative ai due lavaggi della stessa serie, mentre le deviazioni standard si riferiscono alla media del primo dei due lavaggi, in quanto in genere il secondo aveva concentrazioni molto basse, essendo al massimo c. il 17% del primo. Inoltre è riportata la somma totale dei lavaggi (*sub* «Tot. washings»), e le concentrazioni misurate nel materiale digerito *in toto* (*sub* «Tot. digestion»), che confermano sostanzialmente i dati delle digestioni totali effettuate nel settembre 1997 (Tab. 1): i talli della zona A sono più poveri in Ca e Mg di quelli della zona C e molto più ricchi in S, Hg, Al e Fe. Il fatto che in tutti e tre i gruppi si siano sempre misurate delle concentrazioni di metalli anche nelle digestioni totali dei residui dei campioni indica chiaramente che il lavaggio in HNO_3 1M proposto da Brown e Wells (1988) non è sufficiente per solubilizzare tutto il particellato. Le concentrazioni totali misurate con i lavaggi sequenziali e con le digestioni *in toto* sono al contrario molto simili. Ciò conferma che la tecnica dei lavaggi, se completata da una digestione totale del residuo, permette di determinare con efficacia le diverse frazioni di un elemento. Nel nostro caso, gli unici valori sovrastimati riguardano il Ca e il Na; questo probabilmente è dovuto al fatto che si misuravano, in piccoli campioni (c. 50 mg in peso), concentrazioni molto elevate di questi elementi, mentre lo strumento utilizzato per queste misure non era sensibile come quello utilizzato per determinare le concentrazioni degli altri elementi.

I dati delle concentrazioni dei lavaggi, dopo essere stati espressi in percentuale rispetto alla concentrazioni totale (parte inferiore di Tab. 4), sono stati sottoposti a classificazione al fine di individuare gruppi di elementi con simili modelli distributivi nei compartimenti del tallo. Il dendrogramma ottenuto è riportato in Fig. 3; esso permette di riconoscere tre gruppi principali di elementi, come segue:

I gruppo: è costituito da Ca e Mg, che sono presenti prevalentemente a livello di pareti cellulari. Il Ca è quasi esclusivamente associato alla parete cellulare in quanto esso viene dilavato quasi completamente (c. 90%) dalla soluzione di NiCl_2 a freddo. Il citoplasma contiene tutto il Ca rimanente (c. il 10% del totale), mentre non sono presenti particellati, quali cristalli di ossalato di Ca, che sono presenti in molti licheni (Wadsten e Moberg, 1985; Modenesi *et al.*, 1997; Salvadori e Zitelli, 1981); questo dato è stato confermato anche mediante analisi microdiffrattometrica a raggi infrarossi (D. Pinna, *in litt.*) e da osservazioni di sezioni al microscopio a luce polarizzata (P. Modenesi, comm. pers.) Il Mg sembra avere un'affinità inferiore al Ca per i gruppi di legame della parete cellulare, in quanto la sua concentrazione in questo distretto è solo il 38% nei talli della zona A e il 67% nei talli della zona C. Questo elemento è presente anche sotto forma di particellato insolubile, dal momento che il materiale residuo contiene il 32.1% (talli della zona

Tab. 2

Bark	Al	Fe	S%	Hg	Cu	B
A	2057	1305	0.17	4.7	77.2	9.8
C	2599	1358	0.125	2.06	10.26	17.65
Bark	Mg%	Ca%	Na	K%	Mn	Zn
A	0.045	1.24	90.6	0.04	92.3	11.3
C	0.1	2.1	71.8	0.045	122.7	11.6

Contenuto totale di Al, Fe, S, Hg, Cu, B, Mg, Ca, Na, K, Mn e Zn (ppm o % ove indicato) nei due campioni di corteccia di *Castanea sativa* raccolti nelle zone A e C dell'area di studio.

Tab. 3

Bark / Lichen	Al	Fe	S	Hg	Cu	
A	1.45	1.40	1.41	0.17	0.14	
C	0.79	0.94	1.28	0.17	0.99	
Bark / Lichen	Mg	Ca	Na	K	Mn	Zn
A	1.88	0.37	0.99	10.93	0.76	4.70
C	0.91	0.25	1.14	9.84	0.63	4.56

Valori del rapporto tra i contenuti totali di Al, Fe, S, Hg, Cu, Mg, Ca, Na, K, Mn e Zn misurati nelle cortecce di *Castanea sativa* (Tab. 2) e nei talli di *Parmelia sulcata* (Tab. 1) delle zone A e C dell'area di studio.

A) e il 12.4% (talli della zona C) del Mg totale; inoltre c. il 3% del Mg viene rimosso dal lavaggio in acqua, indicando che una piccola frazione del contenuto totale è presente sulla superficie dei talli, oppure è immediatamente disponibile negli spazi interifali.

II gruppo: è costituito da K e Na, due elementi a distribuzione prevalentemente intracellulare, a cui si associa anche lo S, che ha un comportamento anfotero, in quanto c. il 50% è presente a livello citoplasmatico e un buon 40% sembra essere di natura particellare o non è quantomeno portato in soluzione dalla bollitura in NiCl₂. Il K è presente per la maggior parte all'interno delle cellule, in quanto viene liberato per c. il 78% nella soluzione bollita di NiCl₂; c. il 7% è presente però sia sotto forma di particellato che come ioni legati alle pareti e alle membrane. Aliquote di Na sono presenti in tutti i lavaggi, compresa la digestione totale del residuo; una notevole aliquota (c. il 20%) è immediatamente disponibile, essendo presente negli spazi intercellulari e sulla superficie esterna del lichene, anche se comunque la sua localizzazione è prevalentemente intracellulare.

III gruppo: comprende Al, Fe e Hg, che sono presenti soprattutto sotto forma particellare. L'Al viene recuperato infatti per il 99% soltanto mediante digestione totale, men-

tre piccole frazioni di Fe e Hg sono comunque presenti sia all'interno (Hg = c. 17%, Fe = c. 8%) che all'esterno (c. 3%) delle cellule, e corrispondono perciò alle aliquote metabolicamente disponibili (Brown, 1987).

In Tab. 5 si riporta il rapporto percentuale tra le concentrazioni medie di ciascun elemento nei diversi compartimenti dei talli delle zone A e C. Se si considerano i valori dei lavaggi dei talli della zona C alla stregua di bianchi, questo rapporto permette di valutare in quale compartimento cellulare dei talli della zona A ci sono contenuti anomali degli elementi, con l'annotazione che in considerazione dell'elevata deviazione standard dei valori medi di Tab. 5 si possono considerare come significativi solo i valori che sono maggiori del 130% o minori del 70%.

Il Ca nei talli della zona A ha contenuti molto inferiori sia a livello di parete (71.3%) che a livello citoplasmatico (38.9%). Una possibile spiegazione delle cause della carenza del Ca sarà data nei paragrafi seguenti. Anche il Mg è più scarso nei compartimenti esterni, sia nella frazione cationica libera (43.8%) che in quella di parete (37.6%). A differenza del Ca, però, i talli della zona A hanno contenuti normali di Mg a livello citoplasmatico (108%) e contenuti molto più elevati di particellato (172%).

Il Na e il K hanno invece concentrazioni normali nei diversi compartimenti: nel citoplasma dei talli della zona A, ad esempio, il loro contenuto è pari rispettivamente al 101% e al 110% di quello dei talli della zona C. Questo risultato, insieme al fatto che il contenuto di K nel secondo lavaggio di NiCl_2 freddo era pari solo all'8% del primo, permette di escludere l'ipotesi che i talli della zona A presentino danneggiamenti a livello delle membrane cellulari. Tale fenomeno infatti provoca normalmente delle anomalie nella distribuzione tra i diversi compartimenti del Na e soprattutto del K (Buck e Brown, 1979; Brown e Brown, 1991), a causa dell'inefficiente funzionamento dei meccanismi di regolazione osmotica. Ciò implica una perdita di K^+ molto elevata che si traduce in una concentrazione molto elevata anche nel secondo lavaggio di NiCl_2 freddo (Brown e Brown, 1991).

Come discusso in precedenza, il contenuto di Hg, Al e Fe è molto elevato in tutti i compartimenti cellulari dei talli della zona A; ciò è probabilmente dovuto ad un maggior apporto di questi elementi, in quanto sono particolarmente rilevanti i loro valori in forma particellare insolubile (rispettivamente 364.3%, 141.5% e 152.6%). Ancora più interessante è l'elevato contenuto citoplasmatico del Fe (315.9%) nei talli della zona A, tanto più che la concomitante presenza di H_2S potrebbe indurre la trasformazione dalla forma ferrica, normalmente presente a livello citoplasmatico, a quella ferrosa, che notoriamente è fitotossica, in quanto l' E_{red}° del Fe^{3+} è notevolmente più elevato dell' E_{red}° dell' H_2S (0.77 contro 0.14 volts: Dean, 1985). Non è escluso che questo anomalo contenuto di Fe possa derivare dalla maggior solubilizzazione in ambiente acido (pH 3.5) del particellato minerale contenente Fe.

Lo S è ovviamente molto più abbondante nei talli della zona A, più esposti al solfuro d'idrogeno, che nei talli della zona C, e risulta presente soprattutto come particellato e a livello citoplasmatico. Va notato però che lo S misurato tramite digestione totale del residuo dei lavaggi non deriva solo da particellato insolubile, ma anche dalla frazione di composti organici scarsamente idrosolubili eventualmente presenti, mentre lo S citopla-

smatico deriva principalmente da composti sulfidrilici solubili fuoriusciti non per l'azione di sostituzione del Ni, ma bensì per la rottura delle membrane plasmatiche in seguito al processo di bollitura. Diversi studi (de Kok *et al.*, 1983a; de Kok *et al.*, 1985; de Kok *et al.*, 1985; Maas *et al.*, 1985; Maas *et al.*, 1987a; Maas *et al.*, 1987b; Maas *et al.*, 1988; Buwalda *et al.*, 1988) condotti principalmente su piante di *Spinacia oleracea* hanno dimostrato che l'esposizione a concentrazioni di H₂S di 2.5 ppm provoca la formazione all'interno delle cellule vegetali di composti sulfidrilici solubili quali il glutatione, un tripeptide (glu-cys-gly) normalmente presente nelle cellule vegetali (Rennenberg, 1982, 1987), e i suoi precursori (la serina, l'O-acetil-serina e la cisteina), mentre non ha effetto, a differenza dell'SO₂, sulle concentrazioni dei solfati (Maas *et al.*, 1987b).

Riassumendo, i presenti risultati fanno escludere l'ipotesi che i talli di *P. sulcata* della zona A subiscano dei danneggiamenti a livello delle membrane cellulari; questo fenomeno infatti avrebbe provocato anomalie nella distribuzione del Na e soprattutto del K (Buck e Brown, 1979; Brown e Brown, 1991). Inoltre, se si escludono i metalli le cui difforme concentrazioni dipendono evidentemente dalle emissioni gassose della zona A (S, Hg) e dal sollevamento di polveri (Al e Fe), solo il Ca e il Mg mostrano evidenti differenze tra le due zone, essendo meno concentrati nei talli della zona A; ciò potrebbe anche spiegare la loro difforme localizzazione nei compartimenti cellulari, tra cui il citoplasma.

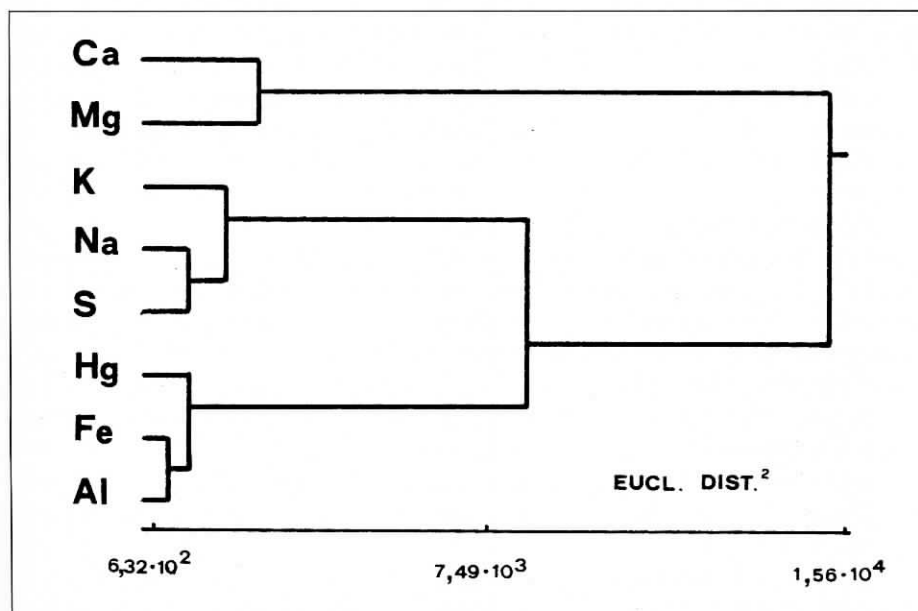


Fig. 3 - Dendrogramma della classificazione dei metalli ottenuta in base ai dati di Tab. 4, espressi in percentuale rispetto al contenuto totale di ciascun metallo. Misura di somiglianza: distanza euclidea; metodo di clustering: minima varianza.

Tab. 4

Zone	Ca		Mg		K		Na	
	A	C	A	C	A	C	A	C
H ₂ O	0	0	13.4 ± 6.9	31.1 ± 8.6	256 ± 76	352 ± 108	25.7 ± 10.3	26.9 ± 4
Cold NiCl ₂	5075 ± 1069	7118 ± 1047	208 ± 54	553 ± 75	256 ± 54	206 ± 43	18.5 ± 2	25.8 ± 11.8
Boiled NiCl ₂	333 ± 444	855 ± 757	151 ± 32	140 ± 30	2868 ± 738	2852 ± 647	66.3 ± 11	60.4 ± 12.6
Acid	0	0	0	0	0	0	11.2 ± 2.7	15.1 ± 3.9
Residual	0	0	175 ± 118	102 ± 31	287 ± 161	217 ± 53	11.16 ± 4.4	8.8 ± 3.8
Tot. washings	5408	7973	547	826	3667	3627	133	137
Tot. digestion	1932 ± 1232	3949 ± 1125	530 ± 119	854 ± 63	3684 ± 729	3141 ± 544	72 ± 13.7	83.8 ± 10.7
H ₂ O	0%	0%	2.4%	3.8%	7.0%	9.7%	19.4%	19.6%
Cold NiCl ₂	93.8%	89.3%	38%	67%	7%	6%	14%	19%
Boiled NiCl ₂	6.2%	10.7%	27.5%	16.9%	78.2%	78.6%	49.9%	44.1%
Acid	0%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	11%
Residual	0%	0%	32.1%	12.4%	7.8%	6.0%	8.4%	6.4%
Zone	Si ¹		Hg ¹		Fe		Al	
	A	C	A	C	A	C	A	C
H ₂ O	200 ± 70	101 ± 14	0.02 ± 1.2x10 ⁻³	0.01 ± 0.6x10 ⁻³	2.5 ± 0.9	1.3 ± 0.4	18.6 ± 6.1	13.2 ± 6.8
Cold NiCl ₂	42.1 ± 24.5	46.7 ± 19	-	-	36.1 ± 9.4	24.9 ± 2.7	n.d.	n.d.
Boiled NiCl ₂	1456 ± 340	970 ± 299	0.07 ± 4.2x10 ⁻³	0.06 ± 3.6x10 ⁻³	121 ± 42.7	38.4 ± 5.1	n.d.	n.d.
Acid	1.61 ± 5.1	11.21 ± 28	0.02 ± 1.2x10 ⁻³	0.04 ± 2.4x10 ⁻³	42.1 ± 20	14.8 ± 18.2	n.d.	n.d.
Residual	1063 ± 358	907 ± 219	0.51 ± 0.25	0.14 ± 0.09	969 ± 498	635 ± 109	1650 ± 782	1167 ± 329
Tot. washings	2763	2036	0.62	0.25	1171	714	1669	1181
Tot. digestion	2400 ± 43	1600 ± 29	0.59 ± 0.05	0.27 ± 0.02	1266 ± 62	916 ± 45	1583 ± 57	1343 ± 48
H ₂ O	7.2%	5.0%	3.2%	4.0%	0.2%	0.2%	1.1%	1.1%
Cold NiCl ₂	2%	2%	-	-	3%	3%	0%	0%
Boiled NiCl ₂	52.7%	47.6%	11.3%	24.0%	10.4%	5.4%	0%	0%
Acid	0%	1%	3%	16%	4%	2%	0%	0%
Residual	38.5%	44.6%	82.3%	56.0%	82.8%	88.9%	98.8%	98.8%

Contenuto di Ca, Mg, K, Na, S, Hg, Fe e Al (ppm) misurato nelle soluzioni di lavaggio di due serie di 10 campioni di *Parmelia sulcata* raccolte rispettivamente nelle zone A e C dell'area di studio. I valori di ogni soluzione corrispondono al contenuto di un determinato compartimento (allimo, come segue: H₂O = superficie esterna, spazi intercellulari; Cold NiCl₂ = pareti cellulari e plasmalemma; Boiled NiCl₂ = citoplasma; Acid = componente particellare solubile in HCl 1N; Residual = componente particellare insolubile in HCl 1N, rilevata tramite digestione totale. Si riportano i valori del contenuto totale in metalli ricavati come somma dei valori ottenuti in ogni lavaggio (Tot. Washings) e tramite digestione totale (Tot. Digestion), ed i valori nei singoli lavaggi espressi in percentuale rispetto al contenuto totale dei lavaggi; n.d. = non misurabile. Per ulteriori commenti, v. testo.

Lavaggi a pH diversi

I cationi legati a livello di parete sono considerati da diversi autori (Brown 1976; Nieboer *et al.*, 1978; Boileau *et al.*, 1985; Nieboer e Richardson, 1981; Richardson e Nieboer, 1980; Richardson *et al.*, 1985; Brown e Beckett, 1984, 1985) come immediatamente disponibili per lo scambio con altri cationi, per cui la diversa concentrazione di Ca e Mg nei due gruppi di campioni (Tabb. 1,3,4 e Fig. 1) potrebbe essere dovuta ad una sostituzione intervenuta per opera di altri ioni carichi positivamente, tra cui i protoni liberati dall' H_2S quando questo composto si dissocia in soluzione acquosa, ad esempio nella pioggia, in analogia a quanto ipotizzato da Pakarinen (1985). In effetti il pH delle scorze nelle due zone è nettamente diverso (3.5 contro 5.0, vedi Tretiach e Ganis, 1999), presumibilmente in relazione alla diversa concentrazione di H_2S , in quanto anche le scorze hanno un diverso contenuto di S totale (vedi Tab. 2).

L'evidente azione di sostituzione dei cationi di Ca e Mg a livello di membrane e pareti cellulari a opera degli idrogenioni è dimostrata dai dati di Tab. 6, in cui si riportano i risultati dei lavaggi in due soluzioni diluite di HCl a pH 3.5 e 5 di due gruppi di campioni di *P. sulcata* raccolti nella zona C del transetto derivanti da porzioni dei medesimi talli. Un terzo gruppo di campioni (*sub* «Ref.» in Tab. 6) è stato solamente sciacquato per essere utilizzato come riferimento.

Le concentrazioni di Ca e Mg nei talli lavati nella soluzione di pH 3.5 risultano sempre inferiori, in maniera statisticamente significativa ($\text{Prob}_F < 1\%$), da quelle misurate nei talli lavati a pH 5.0 e nei talli che sono stati semplicemente sciacquati con acqua distillata corrente.

Anche tra questi due ultimi c'è una leggera differenza nel contenuto di Ca e Mg, ma essa è significativa solamente per il Mg ($1\% < \text{Prob}_F < 5\%$), probabilmente perché la concentrazione di idrogenioni nelle due soluzioni è molto simile (l'acqua distillata in equilibrio con la CO_2 atmosferica ha un pH di 5.7). Il lavaggio a pH 5 è stato sufficiente però per determinare una significativa perdita di Na e K dai talli rispetto al contenuto dei campioni che sono stati semplicemente sciacquati in acqua distillata ($\text{Prob}_F < 1\%$ per il Na e $1\% < \text{Prob}_F < 5\%$ per il K), probabilmente a carico della frazione di questi due elementi che è immediatamente disponibile (vedi Tab. 4). La perdita è ancora più elevata in seguito al lavaggio a pH 3.5, tuttavia le due serie di campioni lavati con le due soluzioni di HCl non differiscono significativamente tra di loro, indicando che le membrane hanno mantenuto la loro integrità.

I valori di concentrazione dei quattro cationi misurati nelle due soluzioni dopo i lavaggi confermano quanto appena esposto. Infatti, mentre il Ca ed il Mg sono significativamente più concentrati nella soluzione più acida, non si nota alcuna differenza significativa nel contenuto di Na e di K.

Misure finali del pH delle soluzioni al termine dei lavaggi, non riportate in Tab. 6, dimostrano che la diminuzione della concentrazione degli idrogenioni è stata più accentuata nelle soluzioni che in partenza erano più acide ($\Delta \text{pH} = 1.42 \pm 0.16$ a pH 3.5 e $\Delta \text{pH} = 1.28 \pm 0.58$ a pH 5), in quanto è maggiore il numero di protoni che si legano ai siti delle membrane cellulari in sostituzione degli ioni bivalenti Ca^{++} e Mg^{++} .

Tab. 5

A/C%	Ca	Mg	K	Na	S	Hg	Fe	Al
H ₂ O	0%	44%	73%	96%	198%	200%	189%	141%
Cold NiCl ₂	71%	37%	124%	72%	90%	–	145%	136%
Boiled NiCl ₂	39%	108%	101%	110%	150%	117%	316%	136%
Acid	0%	0%	0%	74%	14%	50%	284%	136%
Residual	0%	172%	132%	127%	117%	364%	153%	142%
Tot. washings	68%	66%	101%	97%	136%	248%	164%	142%
Tot. digestion	49%	62%	117%	86%	150%	219%	138%	118%

Rapporto percentuale tra i contenuti medi dei diversi elementi misurati nei compartimenti cellulari dei talli di *Parmelia sulcata* raccolti nelle zone A e C.

Tab. 6

Solution	Ca	Mg	K	Na
pH = 3.5	1.88 ± 0.46	0.63 ± 0.17	2.73 ± 0.48	0.61 ± 0.29
pH = 5	0.58 ± 0.14	0.105 ± 0.03	2.37 ± 0.35	0.74 ± 0.34
<i>F</i>	44.92**	53.65**	2.23	0.54
Lichens	Ca%	Mg%	K%	Na
(1) pH = 3.5	0.29 ± 0.06	0.068 ± 0.004	0.243 ± 0.04	35 ± 6.1
(2) pH = 5	0.43 ± 0.058	0.092 ± 0.008	0.24 ± 0.05	41.2 ± 3.5
(3) Ref.	0.48 ± 0.053	0.102 ± 0.008	0.31 ± 0.03	64.4 ± 7.8
<i>F</i> ₍₁₋₂₎	17.94**	44.54**	0.17	4.58
<i>F</i> ₍₂₋₃₎	2.09	5.29*	9.76*	44.25**
<i>F</i> ₍₁₋₃₎	34.65**	90.91**	11.25**	52.51**

Contenuto in Ca, Mg, K e Na (ppm o in % ove indicato) nelle due soluzioni acide a pH 3.5 e 5.0 (sopra) utilizzate per lavare delle porzioni di c. 50 mg di sei talli di *Parmelia sulcata* raccolti nella zona C, e nelle porzioni stesse (sotto). I valori di riferimento si riferiscono al contenuto di porzioni di tallo che sono state solamente risciacquate con acqua distillata (Ref.). *F* = valore del test ANOVA univariato con relativo grado di significatività (* = 1% < p < 5%, ** = p < 1%).

Dai risultati di questo esperimento risulta evidente che i valori più elevati di H₂S nella zona A determinano delle differenze quantitative nel contenuto di Ca e Mg a livello delle pareti cellulari a causa dell'occupazione dei siti di legame da parte degli idrogenioni derivanti dalla dissociazione dell'H₂S in soluzioni acquose. Crittenden (1983, 1989) aveva già dimostrato che le concentrazioni di ioni esterni alla membrana potevano variare in seguito a fenomeni piovosi. Nel nostro caso il ridotto contenuto di Ca nelle pareti nei licheni della zona A (che è c. 30% di quelli della zona C, vedi Tab. 5) sembra determinare

una riduzione di ben il 40% del contenuto citoplasmatico. Considerando l'importanza di questo elemento nella regolazione di molti processi fisiologici, si può a ragione ritenere che il deficit del Ca a livello citoplasmatico nei talli della zona A possa causare serie disfunzioni metaboliche, le cui conseguenze devono però essere ancora attentamente valutate.

Conclusioni

La tecnica dei lavaggi sequenziali, se completata da una digestione totale del residuo, si è dimostrata una tecnica particolarmente efficace per verificare la localizzazione intra- ed extracellulare di metalli in tracce nei campioni di *Parmelia sulcata*. I nostri risultati hanno confermato i dati di precedenti studi secondo cui nei licheni tanto il Ca quanto il Mg sono distribuiti prevalentemente a livello di pareti cellulari, e inoltre hanno dimostrato che il contenuto di questi due elementi è significativamente minore nei licheni che crescono in prossimità della sorgente di H₂S. Si è altresì confermato che il K e il Na sono elementi prevalentemente intracellulari, Al, Fe e Hg sono presenti soprattutto sotto forma particellare, mentre lo S ha un comportamento anfotero, essendo presente tanto a livello citoplasmatico quanto sotto forma di particellato.

Inoltre si è potuta verificare la presenza di anomalie nella distribuzione dei metalli nei talli della zona A rispetto ai valori di riferimento misurati nei talli della zona C. Il Ca ed il Mg hanno concentrazioni molto inferiori nei distretti extracellulari. Ciò è dovuto alla parziale sostituzione di questi cationi da parte degli idrogenioni presenti a concentrazioni maggiori nelle cortecce della zona A, a causa dell'azione acidificante dell'H₂S, e non a differenze di accumulo di particellato (l'ossalato di Ca è assente in entrambi i gruppi di campioni). La riduzione della frazione esterna del Ca comporta una riduzione di quella citoplasmatica, che forse è tale da indurre delle disfunzioni metaboliche.

Si può peraltro escludere che le basse concentrazioni dell'H₂S nella zona A inducano dei danni alle membrane, in quanto sia la concentrazione che la distribuzione di K e di Na nelle diverse frazioni dei talli della zona A sono normali, ma esse sono comunque sufficienti per determinare un accumulo principalmente a carico della frazione citoplasmatica dei talli, forse sotto forma di glutatione. Infine il particellato di Hg, Al e Fe si è dimostrato relativamente poco solubile, con concentrazioni molto basse a livello citoplasmatico. Solamente nel caso del Fe si sono misurate delle differenze significative tra le due zone, in quanto nei talli della zona A il Fe citoplasmatico è circa tre volte più elevato che nei talli della zona C; ciò è particolarmente importante in quanto l'H₂S potrebbe indurre la trasformazione del Fe dalla forma ferrica a quella ferrosa, notoriamente nociva. La relativamente elevata concentrazione citoplasmatica del Fe, assieme a quella bassa del Ca, può essere indicata come uno dei fattori di stress per i talli di *P. sulcata* nella zona A della nostra area di indagine. Va sottolineato che il contenuto di Hg riscontrato nei licheni di Acquapassante è molto elevato se confrontato con il valore di background in Italia (che è stimabile in c. 0.07 ppm), anche se non si può definire eccezionale. Studi sui licheni condotti in laboratorio (Puckett, 1976) hanno dimostrato che talli immersi in soluzioni di

HgNO₃ o HgCl 10⁻⁴ M subiscono seri danni alle membrane cellulari con conseguente forte depressione dell'attività fotosintetica. Tali concentrazioni sono però troppo elevate rispetto ai valori che si possono trovare in natura, tanto più che non vengono forniti dati sulle quantità di Hg effettivamente assorbite dai talli sottoposti al trattamento. Si può ragionevolmente presumere pertanto che nel nostro caso gli effetti delle elevate concentrazioni di Hg nei talli della zona A siano trascurabili, tanto più che la continua esposizione a concentrazioni elevate di metalli pesanti sembra poter indurre in alcune specie di licheni degli specifici adattamenti fisiologici (Beckett e Brown, 1984, 1983), che ne aumentano la tolleranza e la resistenza, secondo dei meccanismi che non sono però ancora sufficientemente compresi (Nash, 1996).

In conclusione si può affermare che gli effetti dell'H₂S alle concentrazioni presenti nella zona A (valore medio massimo < 2 ppm) sono prevalentemente di tipo indiretto, in quanto vengono modificate le caratteristiche chimico-fisiche del substrato con conseguente squilibrio nel contenuto citoplasmatico di alcuni elementi.

Ringraziamenti

Si desidera ringraziare il dr Carlo Celesti, la dr Francesca Borghini e la dr Barbara Giomarella (Dipartimento di Scienze Ambientale, Siena) per aver effettuato una parte delle analisi, il dr Duccio Pasqui (Montepulciano) per l'aiuto logistico offerto a M.T. e L.B. durante il loro soggiorno a Siena, e il dr Marco Pecchiari (Dipartimento di Produzione Vegetale e Tecnologie Agrarie, Udine) per utili discussioni e per ricerche bibliografiche. Si ringraziano inoltre la dr Daniela Pinna (Soprintendenza ai Beni Artistici, Bologna) e il dr P. Modenesi (Istituto Botanico «Hanbury», Genova) per aver verificato l'assenza di ossalato di calcio nei talli di *Parmelia sulcata*. Il presente studio è stato finanziato su fondi M.U.R.S.T. (responsabili Prof. P.L. Nimis, Trieste, e Prof. R. Bargagli, progetto «*Crittogame come biomonitors in ecosistemi terrestri*») e da fondi D.T.N. (f.o.o.p.) (responsabile M.T.).

Bibliografia

- Bargagli R. (1989) - *Determination of metal deposition patterns by epiphytic lichens*. Toxicol. Environ. Chem., 18: 249-256.
- Bargagli R. (1990) - *Assessment of metal air pollution by epiphytic lichens: the incidence of crustal materials and of the possible uptake from substrate barks*. Studia Geobot., 10: 97-103.
- Bargagli R. e Barghigiani C. (1991) - *Lichen biomonitoring of mercury emission and deposition in mining, geothermal and volcanic areas of Italy*. Environ. Monit. Assessm., 16: 265-275.
- Bargagli R., Iosco F.P., Barghigiani C. (1987) - *Assessment of mercury dispersal in an abandoned mining area by soil and lichen analysis*. Water, Air Soil Pollut., 36: 219-225.
- Bates J.W. e Brown D.H. (1981) - *Epiphyte differentiation between Quercus petraea and Fraxinus excelsior trees in a maritime area of South West England*. Vegetatio, 48: 61-70.
- Beckett R.P. e Brown D.H. (1983) - *Natural and experimentally-induced zinc and copper resistance in the lichens genus Peltigera*. Ann. Bot., 52: 43-50.
- Beckett R.P. e Brown D.H. (1984) - *The relationship between cadmium uptake and heavy metal tolerance in the genus Peltigera*. New Phytol., 97: 301-311.
- Boileau L.J.R., Nieboer E. e Richardson D.H.S. (1985) - *Uranium accumulation in the lichen Cladonia rangiferina. Part I. Uptake of cationic, neutral and anionic forms of the uranyl ion*. Can. J. Bot., 63: 384-389.
- Brown D.H. e Beckett R.P. (1985) - *Mineral and lichens: acquisition, localisation and effects*. In Surface Physiology of Lichens (Vicente C., Brown D.H., Legaz M.E., eds.), 127-149. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Brown D.H. (1976) - *Mineral uptake in lichens*. In Lichenology: Progress and Problems (Brown D.H., Hawksworth D.L. & Bailey R.H., eds.), 419-439. New York: Academic Press.
- Brown D.H. (1987) - *The location of mineral elements in lichens: implication for metabolism*. Bibl. Lichenol., 25: 361-375.
- Brown D.H. e Brown R.M. (1991) - *Mineral cycling and lichens: the physiological basis*. Lichenologist, 23: 293-307.
- Brown D.H. e Wells J.M. (1988) - *Sequential elution technique for determining the cellular location of cations*. In Methods in Bryology (Glime J.M., ed.), 227-233. Nichinan: Hattori Botanical Laboratory.
- Buck G.W. e Brown D.H. (1979) - *The effects of dessication on cation location in lichens*. Ann. Bot., 44: 265-277.
- Buwalda F., de Kok L.J., Stulen I. e Kuiper P.J.C. (1988) - *Cysteine, γ -glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur*. Physiol. Plant., 74: 663-668.
- Castello M., Nimis P.L., Alleteo D. e Bellio M.G. (1994) - *Biomonitoring of SO₂ and metal pollution with lichens and bark in Savona*. Boll. Soc. Adr. Sc., 75 (1): 61-83.
- Connor J.J. (1979) - *Geochemistry of ohia and soil lichen, Puhimau thermal area*. Sci. Tot. Environ., 12: 241-250.

- Crittenden P.D. (1983) - *The role of lichens in the nitrogen economy of subarctic woodlands: nitrogen loss from the nitrogen-fixing lichen Stereocaulon paschale during rainfall*. In Nitrogen as an Ecological Factor (Boddy L., Marchant R., Read D.J., eds.), 43-68. Oxford: Blackwell.
- Crittenden P.D. (1989) - *Nitrogen relations of mat-forming lichens*. In Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi (Boddy L., Marchant R., Read D.J., eds.), 243-268. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dall'Aglio M. (1988) - *Impatto ambientale delle energie rinnovabili con particolare riferimento all'energia geotermica*. In Energia, Sviluppo e Ambiente (Habel R. and Stipcich S., eds.), Bologna: Società Italiana di Fisica, Atti di Conferenze, vol. 11: 166-183.
- De Kok L.J., Bosma W., Maas F.M. e Kuiper P.J.C. (1985) - *The effect of short-term H₂S fumigation on water soluble sulphhydryl and glutathione levels in spinach*. Plant Cell Environ., 8: 189-194.
- De Kok L.J., Maas F.M., Godeke J., Haaksma A.B. e Kuiper P.J.C. (1986a) - *Glutathione, a tripeptide which may function as a temporary storage compound of reduced sulfur in H₂S fumigated spinach plants*. Plant Soil, 91: 349-352.
- De Kok L.J., Stulen I., Bosma W. e Hibma J. (1986b) - *The effect of short-term H₂S fumigation on nitrate reductase activity in spinach leaves*. Plant Cell Physiol., 27: 1249-1254.
- De Kok L.J., Thompson C.R. e Kuiper P.J.C. (1983b) - *Sulfide induced oxygen uptake by isolated spinach chloroplasts catalyzed by photosynthetic electron transport*. Physiol. Plant., 59: 19-22.
- De Kok L.J., Thompson C.R., Mudd J.B. e Kats G. (1983a) - *Effects of H₂S fumigation on water-soluble sulphhydryl compounds in shoots of crop plants*. Z. Pflanzenphysiol., 111: 85-89.
- Dean J.A., ed. (1985) - *Lange's Handbook of Chemistry*. 13th Edn. New York: McGraw-Hill.
- Dey J.P. (1978) - *Fruicose and foliose lichens of high-mountain areas of the Southern Appalachians*. Bryologist, 81: 1-93.
- Farrar J.F. (1976) - *The uptake and metabolism of phosphate by the lichen Hypogymnia physodes*. New Phytol., 77: 127-134.
- Ferry B.W., Baddeley M.S. e Hawksworth D.L. (1973) - *Air Pollution and Lichens*. London: Athlone Press.
- Floccia M., Gisotti G. e Sanna M. (1985) - *Dizionario dell'inquinamento: cause, effetti, rimedi, normativa*. Bologna: Edizioni NIS.
- Galloway D. e Elix J. (1983) - *The lichen genera Parmelia and Punctelia Krog in Australasia*. New Zeal. J. Bot., 21: 397-420.
- Garty J., Galun M. e Kessel M. (1979) - *Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus*. New Phytol., 82: 159-168.
- Koranda J.J. (1980) - *Studies on boron deposition near geothermal power plants*. Berkeley: U.S. Department of Energy, interim report, UCID 18606.
- LeBlanc F., Comeau G. e Rao D.N. (1971) - *Fluoride injury symptoms in epiphytic lichens and mosses*. Can. J. Bot., 49: 1691-1698.
- Leithe W. (1971) - *The Analysis of Air Pollutants*. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers.

- Loppi S. (1996) - *Lichens as bioindicators of geothermal air pollution in Central Italy*. *Bryologist*, 99: 41-48.
- Loppi S. e Bargagli R. (1996) - *Lichen biomonitoring of trace elements in a geothermal area (Central Italy)*. *Water, Air Soil Pollut.*, 88: 177-187.
- Maas F.K., de Kok L.J., Hoffmann I. e Kuiper P.J.C. (1987a) - *Plant responses to H₂S and SO₂ fumigation. I. Effects on growth, transpiration and sulphur content of spinach*. *Physiol. Plant.*, 70: 713-721.
- Maas F.K., de Kok L.J. e Kuiper P.J.C. (1985) - *The effect of H₂S fumigation on various spinach (Spinacia oleracea L.) cultivars. Relation between growth inhibition and accumulation of sulphur compounds in the plant*. *J. Plant Physiol.*, 119: 219-226.
- Maas F.K., de Kok L.J., Strik-Timmer W. e Kuiper P.J.C. (1987b) - *Plant responses to H₂S and SO₂ fumigation. II. Differences in metabolism of H₂S and SO₂ in spinach*. *Physiol. Plant.*, 70: 722-728.
- Maas F.K., van Loo E.N. e van Hasselt P.R. (1988) - *Effect of long-term H₂S fumigation on photosynthesis in spinach. Correlation between CO₂ fixation and chlorophyll a fluorescence*. *Physiol. Plant.*, 72: 77-83.
- Malholtra S.S. e Hocking D. (1976) - *Biochemical and cytological effects of sulfur dioxide on plant metabolism*. *New Phytol.*, 76: 227-237.
- Matthews K.M. (1981) - *The use of lichens in a study of geothermal radon emission in New Zealand*. *Environ. Pollut.*, 24: 105-116.
- McLean J., Purvis O.W., Williamson B.J. e Bailey E.H. (1998) - *Role for lichen melanins in uranium remediation*. *Nature*, 391(6668): 649-650.
- Modenesi P. (1993) - *An SEM study of injury symptoms in Parmotrema reticulatum treated with Paraquat or growing in sulphur dioxide-polluted air*. *Lichenologist*, 25: 423-433.
- Modenesi P., Canepa R. e Tafanelli A. (1997) - *The structural role of calcium oxalate and medullary architecture in Menegazzia terebrata and Hypogymnia physodes*. *Bibl. Lichenol.*, 68: 101-110.
- Nash T.H., III (1996) - *Nutrients, elemental accumulation and mineral cycling*. In *Lichen Biology* (Nash T.H., III, ed.), pp. 136-153. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nash T.H., III e Gries C. (1991) - *Lichens as Indicators of Air Pollution*. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 4 part C: Air Pollut. (O. Hutzinger, ed.), pp. 1-29. Berlin: Springer Verlag.
- Nieboer E. e Richardson D.H.S. (1981) - *Lichens as monitors of atmospheric deposition*. In *Atmospheric Pollutants in Natural Waters* (Eisenreich S.J. ed.), pp. 339-388. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science.
- Nieboer E., Richardson D.H.S., Lavoie P. e Padovan D. (1979) - *The role of metal-ion binding in modifying the toxic effects of sulphur dioxide on the lichen Umbilicaria muhlenbergii I. Potassium efflux studies*. *New Phytol.*, 82: 621-632.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. e Tommasini F.D. (1978) - *Mineral uptake and release by lichens: an overview*. *Bryologist*, 81: 226-246.
- Nimis P.L. (1986) - *Urban lichen studies in Italy. II. The town of Udine*. *Gortania*, 7: 147-172.

- Nimis P.L. (1993) - *The Lichens of Italy. An annotated catalogue*. Museo Regionale Scienze Naturali, Monografie, XII, Torino.
- Nimis P.L., Bargagli R., Benedet A., Castello M., Ciccarelli A., Gasparo D., Lausi D., Lazzarin G., Olivieri S. e Tretiach M. (1989) - *I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico nell'area di Schio-Thiene-Breganze (VI)*. Atti Mus. St. Nat. Verona, 16: 1-154.
- Nimis P.L., Castello M. e Perotti M. (1991b) - *Lichens as bioindicators of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy)*. Lichenologist, 22: 333-344.
- Nimis P.L., Castello M. e Perotti M. (1992) - *Lichens as biomonitors of heavy metals deposition in the surroundings of La Spezia (NW Italy)*. In *Plants as Heavy Metals pollution monitors of the Terrestrial Environment* (B. Markett, ed.), pp. 265-284. Weinheim: VCH.
- Nimis P.L., Gasparo D. e Lazzarin G. (1991a) - *Lichens as bioindicators of SO₂ pollution in the Veneto Region (NE Italy)*. Studia Geobot., 11: 3-76.
- Nimis P.L., Gasparo D. e Lazzarin G. (1994) - *Biomonitoring of SO₂ and metal pollution with lichens in the Province of Treviso (NE Italy)*. Atti Seminario di Studi «Dalla tossicologia alla ecotossicologia», pp. 9-27, Pordenone.
- Pakarinen P. (1985) - *Mineral element accumulation in bog lichens*. In *Lichen Physiology and Cell Biology* (Brown D.H., ed.), pp. 185-192. New York: Plenum Press.
- Perry R.A., Atkinson R. e Pitts J.N. (1976) - *Rate constants for the reaction of OH⁻ + H₂S → H₂O + SH⁻ and OH⁻ + NH₃ → H₂O + NH₂⁻ over the temperature range 297-427°K*. J. Chem. Physics, 64: 3237-3239.
- Puckett K.J. (1976) - *The effect of heavy metals on some aspects of lichen physiology*. Can. J. Bot., 54: 2695-2703.
- Puckett K.J., Richardson D.H.S., Flora W.P. e Nieboer E. (1974) - *Photosynthetic ¹⁴C fixation in the lichen Umbilicaria muhlenbergii (Ach.) Tuck. following short exposures to aqueous sulfur dioxide*. New Phytol., 73: 1183-1192.
- Purvis O.W. e Halls C. (1996) - *A review of lichens in metal-enriched environments*. Lichenologist, 28: 571-601.
- Rennenberg H. (1982) - *Glutathione metabolism and possible biological roles in the higher plants*. Phytochem., 21: 2771-2781.
- Rennenberg H. (1987) - *Aspects of glutathione function and metabolism in plants*. In *Plant Molecular Biology* (Von Wettstein D. and Chua H.H., eds). NATO Adv. Stud. Inst. New York: Plenum Press.
- Richardson D.H.S. e Nieboer E. (1981) - *Lichens and pollution monitoring*. Endeavour, 5: 127-133.
- Richardson D.H.S., Nieboer E., Lavoie P. e Padovan D. (1984) - *Anion accumulation by lichens I. The characteristics and kinetics of arsenate uptake by Umbilicaria muhlenbergii*. New Phytol., 96: 71-82.
- Salvadori O. e Zitelli A. (1981) - *Monohydrate and dihydrate calcium oxalate in living lichen incrustations biodeteriorating marble columns of the basilica of Santa Maria Assunta on the island of Torcello (Venice)*. In *The Conservation of Stone II, Proceedings of Int. Symp.* (Rossi Manaresi R., ed.), pp. 379-390. Bologna: Centro Conservazione Sculture all'Aperto.

- Sawyer C.N., Macarty P.L. e Parkin G.F. (1994) - *Chemistry for Environmental Engineering*. New York: McGraw-Hill.
- Seaward M.R.D. (1993) - *Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies*. Environ. Reviews, 1: 73-91.
- Seaward M.R.D. e Hitch C.J.B. (1982) - *Atlas of the lichens of the British Isles*. In Natural Environment Research Council, vol. 1, University of Bradford.
- Shooter D., Watts S.F. e Hayes A.J. (1995) - *A passive sample for hydrogen sulfide*. Environ. Monit. Assessm., 38: 11-23.
- Tomassini F.D., Lavoie P., Puckett K.J., Nieboer E. e Richardson D.H.S. (1977). - *The effect of time of exposure to sulphur dioxide on potassium loss from and photosynthesis in the lichen Cladonia rangiferina (L.) Harm*. New Phytol., 79: 147-155.
- Tretiach M. e Ganis P. (1999). - *Hydrogen sulphide and epiphytic lichen vegetation: a case study on Mt. Amiata (Central Italy)*. Lichenologist, 31: 163-181.
- Unsworth M.H., Crawford D.V., Gregson S.K. e Rowlett S.M. (1985) - *Pathways for sulfur from the atmosphere to plants and soil*. In Sulfur Dioxide and Vegetation (Winner W.E., Mooney H.A. and Goldstein R.A., eds.), pp. 375-388. Stanford, California: Stanford University Press.
- Wadsten T. e Moberg R. (1985) - *Calcium oxalate hydrates on the surface of lichens*. Lichenologist, 17: 239-245.
- Wildi O. e Orlóci L. (1983) - *Management and Multivariate Analysis of Vegetation Data*. 2nd ed. Swiss Fed. Inst. For. Res. Rep., 215, Birmensdorf.
- Wirth V. (1980) - *Flechtenflora. Ökologische kennzeichnung und bestimmung der flechten Südwestdeutschlands und angrenzender gebiete*. Stuttgart: Ulmer.