

# **Biomonitoraggio ambientale dell'inquinamento atmosferico mediante muschi e licheni**

## **Stato dell'arte sulle tecniche di biomonitoraggio - Analisi della bibliografia scientifica inerente le tecniche di biomonitoraggio, della legislazione vigente e di eventuali processi di normazione**

### **ATTENZIONE!!!**

è espressamente vietata la diffusione di questo testo ancora allo stato di BOZZA sul web o la sua pubblicazione anche solo parziale a mezzo stampa.  
Chi scarica questi files implicitamente sottoscrive queste condizioni.

---

<b>Responsabile scientifico</b>	Prof. Mauro Tretiach – DSV; email: tretiach@units.it
<b>Testi</b>	Dott. Guido Incerti, Prof. Mauro Tretiach
<b>Elaborazioni</b>	Dott. Guido Incerti
<b>Allestimento figure e tabelle</b>	Dott. Guido Incerti
<b>Data ultima versione</b>	<b>BOZZA</b> al 04/02/2016
<b>Contenuto</b>	Testo (67 pp.), tabelle (10).

---

## INDICE

### 1. INTRODUZIONE

### 2. STATO DELL'ARTE SULL'USO DI LICHENI E MUSCHI NEL BIOMONITORAGGIO

#### 2.1 I LICHENI COME BIOMONITORS

#### 2.2 LICHENI E BIOINDICAZIONE

#### 2.3 LICHENI E BIOACCUMULO

#### 2.4 I MUSCHI COME BIOMONITORS

### 3. NORMATIVA VIGENTE IN AMBITO NAZIONALE E INTERNAZIONALE

#### 3.1 BIOMONITORAGGIO E QUALITA' DELL'ARIA

#### 3.2 IL BIOMONITORAGGIO NELLA LEGISLAZIONE EUROPEA E NAZIONALE

#### 3.3 IL BIOMONITORAGGIO NELLA VALUTAZIONE DI IMPATTO AMBIENTALE

#### 3.4 PROCESSI DI NORMAZIONE E LINEE GUIDA METODOLOGICHE

##### 3.4.1 BIODIVERSITA' LICHENICA

##### 3.4.2 BIOACCUMULO TRAMITE LICHENI *IN SITU*

##### 3.4.3 BIOACCUMULO TRAMITE TRAPIANTI LICHENICI

##### 3.4.4 BIOACCUMULO TRAMITE *LICHEN E MOSS-BAGS*

##### 3.4.5 BIOACCUMULO TRAMITE MUSCHI AUTOCTONI

##### 3.4.6 DETERMINAZIONE ANALITICA DI ELEMENTI IN TRACCIA

### 4. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUZIONE

Il biomonitoraggio ambientale dell'inquinamento atmosferico, basato sull'utilizzo di licheni e muschi come indicatori biologici per la valutazione della qualità dell'aria, è oggi molto diffuso. Negli ultimi trent'anni sono stati pubblicati numerosi studi, con lo sviluppo di metodi originali, l'adattamento al territorio nazionale di tecniche elaborate all'estero e l'ottimizzazione di protocolli operativi per le tecniche maggiormente sviluppate. Questa solida base di esperienze, in alcuni casi, ha condotto alla normazione tecnica di alcune procedure a livello internazionale. In altri, il livello di standardizzazione ha permesso la definizione di linee guida a livello nazionale e di scale di interpretazione basate sull'analisi statistica di grandi quantità di dati.

Le tecniche di biomonitoraggio permettono di identificare lo stato di alcuni parametri ambientali sulla base degli effetti da essi indotti su organismi sensibili. Questi si manifestano a due livelli, che corrispondono a due categorie di tecniche:

- a) modificazioni morfologiche, fisiologiche o genetiche a livello di organismo, di popolazione o di comunità: tecniche di bioindicazione, che stimano gli effetti di variazioni ambientali su componenti sensibili degli ecosistemi. La biodiversità dei licheni epifiti ha dimostrato di essere un eccellente bioindicatore dell'inquinamento prodotto da sostanze gassose fitotossiche (in particolare per biossido di zolfo e ossidi di azoto). L'utilizzo di muschi come bioindicatori, secondo metodiche diffuse in Nord Europa, è stato applicato più raramente a livello nazionale, in seguito alla scarsa diffusione di muschi autoctoni nel nostro paese in aree soggette ad emissioni di inquinanti fitotossici.
- b) accumulo di sostanze: tecniche di bioaccumulo, che misurano le concentrazioni di sostanze in organismi in grado di assorbirle ed accumularle dall'ambiente. Le tecniche di bioaccumulo correntemente utilizzate permettono di valutare alterazioni ambientali dovute a deposizioni di inquinanti persistenti aerotrasportati. L'esperienza più vasta e di più lungo periodo è riferita al bioaccumulo di inquinanti inorganici, quali elementi in traccia, sia in licheni epifiti che in muschi epigei. Nel passato sono stati utilizzati licheni e muschi come bioaccumulatori per lo studio delle deposizioni di radionuclidi e fluoruri. Più recentemente, tali tecniche sono state sperimentate positivamente per il bioaccumulo di inquinanti organici come ammoniaca, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), diossine e furani (PCDD/F).

A livello concettuale le differenze tra tecniche di bioindicazione e di bioaccumulo non sono sostanziali, anche se le prime si basano su misure biologiche, le seconde su analisi chimiche: entrambe rientrano nella definizione del termine "biomonitoraggio" proposta da [Nimis \(1999a\)](#): *"analisi di componenti degli ecosistemi reattivi all'inquinamento, per la stima di deviazioni da situazioni normali"*.

E' corrente una distinzione tra biomonitori *passivi*, già presenti sul territorio, e quelli *attivi*, posizionati dall'operatore. Tale distinzione, secondo [Nimis \(1999b\)](#) può apparire impropria e fuorviante, e dovrebbe essere abbandonata. Anche la frequente affermazione per cui il biomonitoraggio produce dati *qualitativi*, di *qualità* dell'aria,

piuttosto che dati quantitativi di inquinamento, non è corretta. I termini "*qualità dell'aria*" ed "*inquinamento dell'aria*", spesso utilizzati come sinonimi, coprono concetti diversi (Nimis 1990, 1991).

L'inquinamento, espresso in termini di concentrazioni misurate strumentalmente, è di facile definizione operativa, ma il suo monitoraggio è difficile, per i seguenti motivi:

- a) le concentrazioni di inquinanti in atmosfera sono molto variabili nello spazio e nel tempo; il che implica studi condotti su base statistica, per lunghi periodi, e con dense reti di punti di misura;
- b) gli alti costi degli strumenti ne limitano fortemente il numero, per cui i dati strumentali hanno spesso una scarsa qualità statistica, in termini di rappresentatività territoriale, nonostante la precisione delle singole misure;
- c) la strumentazione normalmente utilizzata rileva un numero estremamente esiguo di sostanze inquinanti.

Il termine *qualità dell'aria* si riferisce invece agli *effetti* dell'inquinamento su diversi soggetti, tra cui l'uomo, altri animali, piante, o oggetti inorganici, come i manufatti, artistici e non; la sua definizione operativa dovrebbe venire affidata ad indici numerici basati su un altissimo numero di parametri, il che è reso quasi impossibile dalle limitate conoscenze su:

- a) effetti di singole sostanze inquinanti su uomo, animali, piante;
- b) effetti sinergici o antagonisti degli inquinanti su diversi organismi e sui loro diversi stadi di sviluppo;
- c) trasferimento degli inquinanti negli ecosistemi;
- d) dal fatto che il danno provocato dagli inquinanti non sempre dipende da valori medi, ma anche da quelli massimi, o dalla durata dell'esposizione.

Queste difficoltà hanno portato alla ricerca di *indicatori della qualità dell'aria*, cioè di parametri della più diversa natura che si suppongono correlati con la *qualità dell'aria*. In assenza di una definizione operativa del termine *qualità dell'aria*, gli *indicatori* diventano il solo modo per definirla. Secondo Nimis (1991, 1999a,b) ciò comporta un ragionamento circolare ("*la qualità dell'aria è ciò che si misura attraverso gli indicatori di qualità dell'aria*"), che sarebbe inaccettabile dal punto di vista scientifico.

Le tecniche di biomonitoraggio producono dati biologici: misure di biodiversità, di variazioni nell'assetto morfologico, fisiologico o genetico degli organismi, misure delle concentrazioni di sostanze negli organismi. Essi hanno un interesse intrinseco, indipendentemente dall'eventuale correlazione con dati strumentali di inquinamento. Il biomonitoraggio non dovrebbe utilizzare gli organismi *come centraline*, né dovrebbe fornire stime di una non meglio definita *qualità dell'aria*: esso misura deviazioni da condizioni *normali* di componenti degli ecosistemi reattivi all'inquinamento, utili per stimare in particolare (ma non sempre) gli effetti combinati di più inquinanti sulla componente biotica.

Va sottolineato che il biomonitoraggio non deve essere visto come alternativo a quello strumentale, potendo fornire informazioni importanti per il monitoraggio dell'inquinamento, individuando possibili zone a rischio, ed ottimizzando la localizzazione degli strumenti di misura.

## **Limiti e vantaggi delle tecniche di bioindicazione e bioaccumulo**

Ogni tecnica presenta limiti e vantaggi specifici, che vanno attentamente considerati nella pianificazione di reti di monitoraggio biologico. I limiti più frequenti sono:

- a) alcune tecniche (soprattutto quelle con biomonitors autoctoni) non sono applicabili ovunque; ad esempio, l'uso di licheni autoctoni come bioaccumulatori non è possibile in aree molto inquinate con scarsità di licheni idonei al campionamento;
- b) non vi è sempre una relazione univoca tra dati biologici e concentrazioni in atmosfera di specifici inquinanti, in primo luogo a causa degli effetti sinergici / antagonisti di più inquinanti e di altri fattori ecologici sugli organismi;
- c) non è sempre possibile elaborare un'unica scala di interpretazione dei dati biologici in termini di inquinamento, valida per tutto il territorio nazionale;
- d) alcune tecniche non permettono di rilevare immediatamente fenomeni acuti di alterazione ambientale, in quanto la reazione degli organismi richiede un certo tempo per essere apprezzabile; in certi casi il monitoraggio temporale può venire effettuato soltanto a distanza di mesi o di anni.

I principali vantaggi sono:

- a) possibilità di ottenere rapidamente, a costi relativamente contenuti, e con un'alta densità di campionamento, una stima degli effetti biologici di più inquinanti su organismi reattivi, a diverse scale territoriali;
- b) individuazione rapida di aree con potenziale superamento dei limiti-soglia per alcuni importanti inquinanti primari;
- c) valutazione dell'efficacia di misure per la riduzione delle emissioni di inquinanti su lunghi periodi;
- d) individuazione di potenziali aree a rischio per la localizzazione ottimale degli strumenti di misura dell'inquinamento;
- e) individuazione di pattern di trasporto a lunga distanza e deposizione di inquinanti, e verifica dell'affidabilità di modelli diffusionali, a diverse scale territoriali.

Vantaggi e limiti di ogni tecnica vanno valutati di volta in volta rispetto agli obiettivi e alle scale territoriali. Una volta chiariti i limiti, molte metodiche si rivelano di grande efficacia e predittività, come comprovato da una ricchissima letteratura a livello internazionale.

## **Variabilità dei dati**

L'alta variabilità dei fenomeni biologici è la causa principale delle difficoltà incontrate in Ecologia nel formulare previsioni affidabili. Il trattamento matematico della complessità non sempre consente stretti limiti di confidenza nella formulazione di modelli predittivi. Il trattamento matematico dell'incertezza è un punto fondamentale nelle scienze ambientali, e - contrariamente a quanto avviene correntemente - l'incertezza, ovunque presente, dovrebbe venire resa esplicita ed incorporata nei modelli finali. La qualità dei dati, fondamentale negli studi di biomonitoraggio, varia in dipendenza di:

- a) *variabilità del fenomeno*, dovuta principalmente all'interazione di numerosi fattori a livello di organismo e/o di ecosistema. Secondo [Bargagli \(1999\)](#) la mancanza di rigorosi protocolli di campionamento può indurre ad errori anche del 1000%;

- b) *errore di misura*; l'errore strumentale (p.es. nelle tecniche di bioaccumulo) è in genere trascurabile rispetto a quello dovuto all'influenza degli operatori (p.es. in molti studi di bioindicazione); l'intercalibrazione tra operatori è fondamentale in molte tecniche, soprattutto di bioindicazione, che prevedono la determinazione in campo di numerose specie; l'errore di misura è inversamente proporzionale al numero di fattori considerati nello stabilire i protocolli di campionamento.
- c) densità di campionamento, con influenza diversa sulla qualità del dato a seconda della variabilità del fenomeno e delle caratteristiche dell'area di studio.

Uno dei principali criteri per accettare o meno l'utilizzo generalizzato di una data tecnica è l'esistenza di studi di base sulla variabilità dei dati, e sui principali fattori che la influenzano. Paradossalmente, non solo in Italia, studi del genere sono piuttosto rari, il che comporta problemi nell'interpretazione dei risultati. In alcuni casi, però, importanti studi di base hanno proposto protocolli di campionamento tali da ridurre notevolmente la variabilità dei dati. In ogni caso, sarebbe utopico attendersi dati biologici con una variabilità comparabile agli errori strumentali delle misure chimiche e fisiche. L'alta densità di campionamento può però compensare ampiamente l'alta variabilità dei dati. Nelle reti di rilevamento strumentale la precisione della singola misura (innegabilmente molto soddisfacente) viene troppo spesso mistificata per una precisa stima del fenomeno.

### **Strategie di campionamento**

Le indagini di biomonitoraggio hanno diversi obiettivi, e quindi diverse scale territoriali: sono possibili studi su ampia scala, studi di gradiente a distanze crescenti da una presunta fonte emittente, studi *before-after*. Obiettivi, scale territoriali e strategie di campionamento sono interrelati, e non ha senso specificare rigidamente un'unica strategia valida per tutti i casi. Per un adeguato trattamento statistico dei dati, per facilitare il confronto tra studi diversi, e per ridurre la soggettività dell'operatore, è consigliabile - ove possibile - un campionamento basato su criteri probabilistici, basato sulla definizione esplicita della popolazione statistica di riferimento e degli obiettivi campionari. In passato è stata proposta una suddivisione del territorio in Unità Geografiche Operazionali (OGUs) identificate secondo un disegno sistematico, utilizzata a scala nazionale.

Per obiettivi o per situazioni territoriali particolari non vanno esclusi altri tipi di campionamento (lungo transetti per studi di gradiente, campionamento preferenziale, etc.). In particolare, un campionamento preferenziale - spesso ingiustamente discriminato - può risultare adeguato:

- a) quando l'obiettivo si limita alla descrizione della situazione in un'area molto circoscritta;
- b) quando l'obiettivo richiede un'alta densità di campionamento in un'area con generale scarsità di biomonitors autoctoni (il che richiede un'accurata ed esaustiva esplorazione del territorio);
- c) quando l'obiettivo è la comparazione di una serie di siti a rischio precedentemente individuati sulla base di altre informazioni (ad esempio misure derivanti da campionatori passivi o centraline);
- d) quando l'obiettivo è il ri-campionamento di un'area originariamente campionata in modo preferenziale, per evidenziare eventuali variazioni temporali.

In questi casi, tuttavia, l'analisi statistica dei dati, e il confronto con quelli di altri studi, possono divenire problematici.

Non esiste un metodo per stimare una densità di campionamento ottimale, valida per tutte le aree e per tutti gli obiettivi. Per stabilire la densità di campionamento vanno considerati questi fattori principali:

- a) risorse disponibili (massimo numero possibile di punti-stazione);
- b) caratteristiche geomorfologico-orografiche e climatiche dell'area di studio;
- c) disponibilità e distribuzione spaziale di biomonitors autoctoni;
- d) variabilità del dato nell'area di interesse, desumibile da evidenze pregresse o studi pilota;
- e) informazioni sulle principali fonti di emissione, e sui tassi e modelli di dispersione di specifici inquinanti nell'ambiente.

La densità dei punti-misura può variare nell'ambito della stessa area, e una densità maggiore può essere opportuna in aree geomorfologicamente irregolari o in parti del territorio con la maggior variazione geografica dei dati. In questi casi si consiglia:

- a) un campionamento sistematico su scala più ampia in una prima fase;
- b) l'elaborazione dei dati relativi a questo campionamento;
- c) un ulteriore campionamento su scala più ridotta, nelle aree con la maggiore variazione geografica dei dati.

Gli studi di biomonitoraggio permettono densità di campionamento molto maggiori rispetto alle reti di rilevamento strumentale. In molti studi di bioindicazione con organismi sensibili a sostanze che hanno ampi *patterns* di diffusione atmosferica, una densità relativamente bassa può essere accettabile. In studi di bioaccumulo, invece, vanno considerati i possibili tassi di dispersione di specifici inquinanti a partire da presumibili sorgenti di emissione. I pattern di diffusione e trasporto in atmosfera della maggior parte degli inquinanti immessi in atmosfera da attività antropica dipendono dalle dimensioni del particellato e dall'altezza dal suolo delle fonti, e spesso si esauriscono su aree ristrette: una scarsa densità di punti di misura può facilmente rivelarsi inadeguata. Ciò riguarda anche gli algoritmi per la formulazione di modelli spaziali. In Italia, a partire dal primo esempio da parte di [Nimis et al. \(1992\)](#), è frequente l'utilizzo di programmi di interpolazione spaziale per la produzione di cartografia sulla distribuzione dei dati derivanti dal biomonitoraggio. Questi sono consigliabili solo quando giustificato dalla densità spaziale delle stazioni, dalla morfologia del territorio, e dalle ipotesi sui tassi di dispersione dei metalli dalle presunte fonti. In vaste aree geomorfologicamente corrugate e con bassa intensità di campionamento l'uso acritico di tali programmi può portare a risultati inaffidabili. In casi del genere è consigliabile una stima dell'alterazione ambientale limitata ad ogni singolo punto-stazione.

### **Scale di interpretazione**

Una volta stabiliti protocolli di campionamento tali da ridurre al minimo la variabilità dei dati, strategie di campionamento adeguate all'obiettivo e alla scala territoriale, e metodi di elaborazione e presentazione adatti alla struttura dei dati, rimane il fondamentale problema dell'interpretazione dei dati in termini di alterazione ambientale. Per esprimere la deviazione da condizioni "normali" è indispensabile che queste vengano quantificate e per questo si hanno tre strategie principali:

- a) *confronto con condizioni controllate*; possibile per alcuni bioindicatori alloctoni, ad es. con esperimenti di fumigazione che quantifichino la relazione tra concentrazioni di inquinanti e reazioni degli organismi (es: tabacco per il monitoraggio delle concentrazioni di ozono);
- b) *confronto con dati di inquinamento*, o con stime derivanti da modelli di diffusione. Questo approccio, il migliore per tutti i biomonitor autoctoni, è stato seguito in molti casi (ad es. per la bioindicazione tramite licheni). I dati strumentali, però, sono spesso scarsi o assenti –è questo il caso dei metalli in traccia - il che rende problematico qualsiasi confronto statistico. In Italia, sul piano geografico, i dati biologici sono oggi di gran lunga più numerosi di quelli strumentali.
- c) *confronto "interno" all'universo dei dati biologici*. Quest'ultima strategia, spesso la sola possibile per biomonitor autoctoni a causa la carenza di dati strumentali (tipico il caso di quelli relativi ai metalli), richiede un commento a parte.

Vi sono, soprattutto per i bioaccumulatori, almeno tre approcci basati su confronti "interni" per stimare la magnitudo delle alterazioni ambientali in termini di deviazioni dalla norma:

- a) Comparazione con i valori di *background*. Questi possono essere calcolati in diverso modo, ad esempio come media dei valori minimi in aree più vaste di quella di studio, in genere a livello di Paese o di subcontinente. La magnitudo dell'alterazione ambientale è espressa come rapporto tra il valore di una data stazione e quello di *background*. I valori di *background*, però, dipendono da fattori locali indipendenti dall'inquinamento, quali la costituzione lito-pedologica del territorio. In aree con emissioni naturali di mercurio (come in certe parti della Toscana o del Lazio) i *background* locali sono molto più alti che altrove. Il confronto tra i massimi in Italia e quelli locali può ridurre il rischio di sovra- o sottostimare l'alterazione di origine antropica. L'aspetto più problematico di questo approccio però è che solo molto raramente i valori di background per determinate matrici sono stati il risultato di specifiche campagne di ricerca svolte a livello nazionale; più spesso ci si è accontentati di collezionare dati di disparata origine che sono stati vagliati in maniera non sempre esplicita in termini di tecniche analitiche e di raccolta del materiale, ma spesso sottostimando fortemente le variabilità esistenti tra specie utilizzate.
- b) Comparazione con il minimo della singola area di studio. In questo caso il livello di alterazione ambientale è espresso come rapporto tra il dato di una stazione ed il minimo locale, con il vantaggio che molti fattori di disturbo locali (p. es. la litologia) nonché eventuali errori analitici sono o dovrebbero essere omogenei. Lo svantaggio è però quello di non evidenziare fenomeni di alterazione diffusi su tutta l'area di studio. In assenza di valori di background affidabili e/o di misure strumentali, è comunque consigliabile situare alcune stazioni, anche al di fuori dell'area di studio, in ambienti non interessati al tipo di inquinamento i cui effetti si intendono monitorare.
- c) Il terzo approccio è possibile solo con un numero di misure tale da permettere di individuare e definire delle vere e proprie classi di alterazione ambientale su base statistica. Un esempio sono le scale relative alle concentrazioni di metalli nei licheni proposte da [Nimis e Bargagli \(1999\)](#), basate su centinaia di misure su tutto il territorio nazionale, nelle più diverse condizioni naturali e di disturbo antropico.



Dal momento che i dati biologici variano in dipendenza di numerosi fattori, in primo luogo geolitologici (in molti studi di bioaccumulo), e bioclimatici (in molti studi di bioindicazione), qualsiasi scala per interpretare i dati in termini di alterazioni ambientali è valida solo nelle condizioni in cui essa è stata elaborata.

Il dato biologico va quindi ben distinto dalla sua interpretazione in termini di alterazioni ambientali: le ricerche non dovrebbero limitarsi all'uso acritico di tecniche e scale considerate ormai "standard", ma dovrebbero concentrarsi sull'affinamento di scale interpretative in diverse situazioni ambientali e per diversi tipi di alterazione antropogena. Un ruolo fondamentale - supportato finanziariamente dallo Stato - potrebbe venir giocato da Università e altri enti di ricerca di base, che oggi si vedono sin troppo spesso costretti alla pura e semplice applicazione di tecniche routinarie a fini di autofinanziamento. La definizione del biomonitoraggio come stima delle deviazioni da condizioni "normali" richiede un maggiore sforzo di indagine in ecosistemi non disturbati, per quantificare livelli di "naturalità" in situazioni ambientali diverse.

In assenza di scale di interpretazione, molte tecniche di bioaccumulo si limitano ad evidenziare pattern geografici nelle concentrazioni di un dato inquinante. Attraverso le scale di interpretazione si può invece stimare la magnitudo di eventuali deviazioni da situazioni normali. Entrambe le informazioni sono interessanti: la prima per evidenziare fenomeni diffusionali, la seconda per una valutazione in termini di qualità ambientale.

## 2. STATO DELL'ARTE

### SULL'USO DI LICHENI E MUSCHI NEL BIOMONITORAGGIO

Licheni e muschi sono utilizzati come biomonitors per ottenere informazioni qualitative e quantitative su particolari aspetti dell'ambiente. Essendo capaci di assimilare contaminanti atmosferici durante lunghi periodi di tempo, essi riflettono le condizioni del loro ambiente di crescita (De Bruin 1990). Per questi motivi, diversi biomonitors possono essere utili per il monitoraggio dell'inquinamento atmosferico in una data area geografica. Gli organismi sono comunemente impiegati come biomonitors in studi nei quali non sia consigliabile, dato l'elevato costo, l'utilizzo di strumentazione tecnica per misurare il profilo di concentrazione degli inquinanti aerodiffusi lungo periodi di tempo prolungati. Inoltre, i biomonitors possono fornire informazioni integrate sul profilo di diversi inquinanti in atmosfera, poiché sono in grado di accumulare una notevole varietà di sostanze chimiche (Puckett 1988), e sui loro effetti ambientali, inclusi quelli non additivi. La maggior parte degli studi di biomonitoraggio è basata sull'utilizzo di licheni e muschi, sebbene siano stati utilizzati anche funghi, scorze d'albero e foglie di piante superiori (Kansanene Venetvaara 1991, de Nicola et al. 2013). Nel caso di licheni e muschi in particolare è stata dimostrata la capacità di interagire con gli inquinanti atmosferici mediante una varietà di meccanismi diversi, inclusi l'intrappolamento di particolato, gli scambi gassosi, lo scambio cationico superficiale e i fenomeni di bioaccumulo intracellulare (Bargagli e Mikhailova 2002). Inoltre, questi organismi sono in grado di accumulare i contaminanti a livelli di concentrazione molto superiori rispetto ai valori fisiologici di fondo grazie a meccanismi di sequestro che può essere sia extra- che intracellulare.

Storicamente, si fa risalire l'inizio degli studi di biomonitoraggio all'osservazione del declino delle popolazioni licheniche nella città e nella periferia di Parigi a fine '800 (Nylander 1886), ma in realtà le prime osservazioni sono da predatore addirittura di un secolo. Numerosi studi successivi hanno dimostrato l'effetto dell'inquinamento atmosferico su diversi organismi vegetali (Crowther e Ruston 1911; Wieler 1913; Hawksworth 1971). Questo tipo di osservazioni e applicazioni sono noti come studi di bioindicazione, nei quali viene accertata una modificazione morfologica, fisiologica o ecologica degli organismi target a seguito dell'esposizione a condizioni restrittive (De Bruin 1990). Tipicamente, viene valutato lo stato di salute dell'organismo bioindicatore in una data regione geografica, registrandone lo stato morfologico, fisiologico o ecologico (Langmann et al. 2014). Ad esempio, i licheni sono stati utilizzati come bioindicatori dell'inquinamento da acido fluoridrico, acido solfidrico, biossido di zolfo, ossidi di azoto, ozono (Pearson e Skye 1965; Hill 1974; Richardson e Puckett 1973; Nash e Torrey 1971; De Wit 1976; Tretiach e Ganis 1999).

Diversamente, gli studi di biomonitoraggio che forniscono informazioni quantitative ottenute da misure dell'accumulo di sostanze e/o composti inquinanti, che riflettono il profilo dell'ambiente in cui il biomonitor è stato campionato, vengono definiti studi di bioaccumulo. Recentemente, con il progressivo aumento dell'accessibilità alla strumentazione necessaria per la determinazione quantitativa degli analiti, si è assistito a una corrispondente diffusione della letteratura scientifica basata sul confronto tra le concentrazioni ambientali degli inquinanti e il loro contenuto nelle popolazioni biologiche (De Bruin 1990). Ad esempio, in Blasco et al.

(2008) viene riportato il biomonitoraggio della qualità dell'aria nella regione dei Pirenei mediante l'utilizzo di licheni sia come bioindicatori sia come bioaccumulatori, che include sia la mappatura della biodiversità lichenica nell'area di studio, sia informazioni sul contenuto di idrocarburi policiclici aromatici (IPA, o PAH nell'accezione inglese) nei talli lichenici. Tipicamente, i biomonitori possono essere prelevati dai loro siti di crescita e direttamente analizzati per la determinazione del contenuto di inquinanti (bioaccumulatori passivi, o autoctoni, o *in situ*) oppure rimossi da siti di origine prossimo-naturali e trapiantati per periodi di tempo definiti in aree potenzialmente contaminate prima della determinazione analitica (bioaccumulatori attivi, o alloctoni, o trapianti) (Namiensnik e Wardencki 2002). I muschi furono inizialmente utilizzati in Svezia negli anni '50 del secolo scorso per determinare le emissioni di fluoro da sorgenti industriali (MacIntyre 1952) e, a partire dagli anni '60, sono stati utilizzati per il monitoraggio a lungo termine delle deposizioni di metalli pesanti in Scandinavia (Rühling e Tyler 2001).

Gli analiti target degli studi di biomonitoraggio includono inquinanti inorganici, ampiamente studiati, inclusi radionuclidi (Boltersdorf et al. 2014), metalli (e.g. Fe, Zn, Pb, Cu, Mn, Co, Cd, Ni, Cr e Hg), lantanoidi, e altri elementi (Jeran et al. 1996), ammoniaca, zolfo e azoto. Per lo studio di questi inquinanti sono stati utilizzati diversi organismi, inclusi, oltre a licheni e muschi, la scorza e le foglie di diverse specie arboree, il tabacco, piante cerealicole quali mais, frumento e orzo, piante ortive e ornamentali. Gli inquinanti organici vengono accumulati dagli organismi per la loro lipofilia. Gli analiti organici di interesse per il biomonitoraggio includono fenoli (Migaszewski et al. 2002), policloro-bifenili (PCB), policloro-dibenzo-p-diossine e furani (PCDD/F), PAH. Questi ultimi e i loro derivati alogenati, che sono noti per la loro potenziale pericolosità per la salute umana e degli organismi viventi (Varanasi 1989), sono stati studiati utilizzando licheni, muschi, aghi di conifere e scorza d'albero.

La selezione del tipo e della specie di organismo, utilizzato in toto o in parte, è fondamentale per una corretta applicazione delle tecniche di biomonitoraggio. La specie selezionata deve essere ampiamente distribuita nell'area di indagine (Jeran et al. 1996), per poter consentire iniziative di monitoraggio integrate a livello nazionale ed internazionale (Ellerman et al. 2012). Oltre alla diffusione dell'organismo target, devono essere considerate la sua capacità potenziale di bioaccumulo e la sua rilevanza ecologica rispetto agli inquinanti specifici oggetto dello studio. Diverse specie possono essere rappresentative del sistema per diversi periodi temporali, pertanto il periodo di monitoraggio e la ritenzione degli inquinanti deve essere stabilita prima del campionamento. Ad esempio, i muschi mostrano concentrazioni rappresentative di periodi più lunghi rispetto alle foglie di piante superiori (de Nicola et al. 2013). La selezione della specie è importante perché diversi studi hanno dimostrato che specie diverse entro il medesimo gruppo tassonomico (e.g. nei licheni) sono soggette ad una diversa selettività nell'accumulo di contaminanti specifici (Berg e Steinnes 1997, de Nicola et al. 2013). Inoltre, se la relazione tra le concentrazioni degli inquinanti nella specie target e l'esposizione ambientale non è ben definita, l'informazione ottenuta dal biomonitoraggio è puramente qualitativa (De Bruin 1990). Di conseguenza, è necessario determinare chiaramente la relazione causale tra le emissioni inquinanti delle diverse sorgenti ricadenti in area di studio, cui il biomonitor è esposto, e la concentrazione effettivamente bioaccumulata

(Spagnuolo et al. 2013). Ad esempio, nel caso dell'utilizzo di foglie e scorza d'albero, il biomonitor è esposto a una gamma di inquinanti provenienti da diverse matrici ambientali, quali suolo, atmosfera e acque ipogee, mentre nel caso dei licheni, l'apporto di contaminanti è pressoché interamente di origine aerodiffusa. Anche per questi motivi gli organismi di ordine superiore, caratterizzati da meccanismi di scambio con l'ambiente più complessi e diversificati, non sono così adatti come licheni e muschi per il biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico.

L'accumulo di inquinanti aerotrasportati, sia organici sia inorganici, è in relazione con diverse proprietà fisiche e chimiche intrinseche agli inquinanti, come la solubilità in acqua, l'idrofobicità, la pressione di vapore, la granulometria nel caso del particolato atmosferico, lo stato di ossidazione nel caso dei metalli. Fattori ambientali quali temperatura, umidità e pH influenzano i tassi di accumulo (de Nicola et al. 2013).

I primi lavori nel campo del biomonitoraggio furono concentrati sullo studio di relazioni dose-risposta, in termini di correlazione tra i livelli di contenuto elementare in campioni lichenici e di particolato atmosferico (e.g. Jeran et al. 2000). Hanssen et al. (1980), Ross (1990), Berg et al. (1995), così come Berg e Steinnes (1997), dimostrarono una correlazione positiva tra la concentrazione di metalli nei muschi e nelle deposizioni umide. Più recentemente, Augusto et al. (2010) hanno confrontato le concentrazioni di PAH accumulate da licheni e aghi di pino con quelle osservate nei suoli e direttamente in campionamenti d'aria. La correlazione dei campioni atmosferici diretti con i dati osservati sia nei licheni sia in aghi di pino suggeriscono che entrambi gli organismi siano biomonitor efficaci per questi specifici inquinanti.

Le sezioni seguenti sono focalizzate sull'applicazione di licheni e muschi come biomonitor dell'inquinamento atmosferico, con particolare riferimento alle tecniche e alle specie più comunemente utilizzate e alle criticità intrinseche a ciascuna tecnica. Vengono successivamente descritte le tecniche strumentali impiegate per l'estrazione di specifici analiti dalla matrice organica e per la determinazione qualitativa e quantitativa degli analiti estratti.

## 2.1 I LICHENI COME BIOMONITORS

I licheni sono il prodotto di un'associazione simbiotica autosufficiente tra un organismo fotoautotrofo (il fotobionte, in genere un'alga verde o un cianobatterio) e un fungo (il micobionte, nella quasi totalità dei casi un ascomicete) (Hawksworth 1988; Forbes et al. 2009). I licheni sono in genere organismi perenni, che presentano morfologia uniforme e bassi tassi di crescita durante tutto il ciclo vitale. La variabilità morfologica interspecifica dei licheni viene generalmente ricondotta a quattro tipologie principali di forma di crescita, in ordine crescente di complessità e sviluppo tridimensionale: crostosa (tallo assente o appiattito e strettamente adesa al substrato), squamulosa (tallo composto da piccole squamette, a volte embriciate), foliosa (tallo formato da lobi laminari continui più o meno appiattiti, ma scarsamente adesi al substrato) e fruticosa (tallo formato da lacinie più o meno ramificate a sviluppo tridimensionale). Il tasso di crescita radiale annuale varia tra 0.1 e 1.0 mm nel caso dei licheni crostosi e tra 1.0 e 2.5 mm per i licheni foliosi, mentre la crescita annua in lunghezza nei licheni fruticosi varia tra 2.0 e 6.0 mm (Shukla et al. 2014). Tali valori sono in ogni caso puramente indicativi, poiché il dato è estremamente

variabile in ragione sia della specie considerata, sia, a livello intraspecifico, della regione geografica, in relazione soprattutto alla disponibilità idrica da umidità atmosferica e precipitazioni ([Ahmadjian e Hale 1974](#)). Organismi prevalenti in diversi biomi, i licheni tollerano temperature estreme e sono distribuiti dalla tundra artica alle foreste pluviali, ai deserti, sia freddi che caldi. Possono crescere sui più diversi substrati, sia naturali, come rocce, alberi, suolo, legno morto o foglie, sia artificiali, inclusi gomma, plastica, vetro manufatti in pietra, cemento, ceramica, gesso, leghe metalliche ([Shukla et al. 2014](#)).

La colonizzazione e la biodiversità lichenica sono significativamente influenzate da fattori microclimatici quali precipitazioni umide, intensità della radiazione solare, umidità dell'aria, regime eolico e qualità dell'aria ([Nash 1996](#)). L'assenza di cuticola di rivestimento e di sistemi di trasporto dell'acqua (radici e apparato vascolare) ha favorito lo sviluppo di meccanismi per l'acquisizione della maggior parte dei nutrienti direttamente dall'atmosfera ([Bargagli e Mikhailova 2002](#)). Poiché il processo non è ostacolato da meccanismi o vincoli chimico-fisici, ne deriva un accumulo continuo di inquinanti organici ed inorganici sulla superficie e/o all'interno del tallo. Alcune specie epilittiche ed endolittiche, che colonizzano la superficie e l'interno di substrati rocciosi, hanno la capacità di disgregare il substrato grazie al rilascio extra-cellulare di specifiche sostanze chimiche ([Sarret et al., 1998](#)) quando non di enzimi ([Favero Longo et al. 2011](#)). Nel caso dei licheni epifiti, che colonizzano prevalentemente la corteccia degli alberi, il substrato fornisce unicamente supporto fisico al tallo, va quindi esclusa l'acquisizione diretta di nutrienti e/o contaminanti dalla corteccia ([Bargagli et al. 2002](#)). Alcune specie sono particolarmente sensibili alla composizione chimica dell'atmosfera, tanto che concentrazioni elevate di inquinanti ne possono causare la forte riduzione, se non la completa scomparsa in una data area ([Dongarra e Varrica, 1998](#)). La sensibilità agli inquinanti è quindi un requisito fondamentale per l'utilizzo dei licheni in studi di bioindicazione. Altre specie sono più resistenti, capaci di tollerare livelli elevati di inquinanti atmosferici; in alcuni casi possono possedere meccanismi di detossificazione per la degradazione o l'escrezione di contaminanti ([Bačkor e Loppi 2009](#); [Pawlik-Skowrońska et al. 2002](#)). In ogni caso, in condizioni di elevato carico di specifici inquinanti, si osserva una riduzione della crescita ed un'alterazione della morfologia ([Tretiach e Ganis 1999](#), [Hauck et al. 2002](#)).

I primi ricercatori a dettagliare in maniera sistematica la relazione tra la concentrazione di inquinanti in aria e la crescita dei licheni sono stati [Hawksworth e Rose \(1970\)](#) e [Rogers \(1977\)](#), che hanno valutato gli effetti del biossido di zolfo. [Sloof \(1995\)](#) ha analizzato la concentrazione di contaminanti nei talli rispetto a quella del particolato sospeso in atmosfera e delle deposizioni. [Sloof e Wolterbeek \(1991\)](#) hanno verificato la correlazione tra il contenuto elementare di Zn, Co e Sc e determinate concentrazioni atmosferiche. Negli ultimi 30 anni la ricerca nel campo del bioaccumulo tramite licheni è stata condotta sulla maggior parte dei metalli di transizione e lantanoidi, radionuclidi, fluoruri, S e N ([Puckett 1988](#); [Garty 1993](#); [Gombert et al. 2003](#); [Jeran et al. 2007](#); [Forbes et al. 2009](#); [True et al. 2012](#)). I licheni sono stati anche utilizzati per lo studio delle deposizioni di ammoniaca e azoto ([Jovan et al. 2006](#); [Fрати et al. 2007](#)) e radionuclidi ([Hanson 1967](#); [Sawidis e Heinrich 1992](#); [Loppi et al. 2003](#)). [Migaszewski et al. \(2002\)](#) hanno dimostrato la potenzialità dell'utilizzo dei licheni per lo studio di contaminazione da PAH, seguiti da [Guidotti et al. \(2003\)](#), mediante un'applicazione basta su trapianti lichenici. [Augusto et al. \(2004\)](#)

hanno studiato per la prima volta il profilo PCDD/F in campioni lichenici in Portogallo. Per una revisione critica recente sull'utilizzo dei licheni nel biomonitoraggio di inquinanti organici, si veda [Van der Wat e Forbes \(2015\)](#); per quella in particolare di PAHs, [Kodnik et al. \(2015\)](#).

## 2.2 LICHENI E BIOINDICAZIONE

I licheni sono particolarmente sensibili agli stress ambientali, specialmente per quanto riguarda l'inquinamento, l'eutrofizzazione e i cambiamenti climatici ([Galun 1988](#); [Richardson 1992](#); [Nash 1996](#)). Le ragioni principali sono: a) l'assorbimento delle sostanze, da parte dell'intera superficie del lichene avviene esclusivamente con l'apporto atmosferico; b) diversamente dalle piante superiori i licheni non hanno cuticola (lo strato lipofilo con prevalente funzione isolante e protettiva); gli inquinanti possono quindi penetrare inalterati all'interno del tallo, delle cellule fungine e algali secondo semplici gradienti di concentrazione; c) i licheni hanno un lento tasso di accrescimento e scarsa capacità di eliminare eventuali parti danneggiate; d) durante i periodi più umidi i licheni aumentano la loro attività metabolica; e) i licheni continuano a metabolizzare a basse temperature, per questo possono anche subire danni durante i periodi invernali; f) gli inquinanti atmosferici possono gravemente danneggiare la fragile associazione simbiotica.

I primi studi sulla sensibilità dei licheni all'inquinamento atmosferico risalgono al secolo scorso, ma solo da alcuni decenni essi sono stati utilizzati come bioindicatori su larga scala, grazie alla disponibilità di misure dirette dell'inquinamento, indispensabili per quantificare le relazioni tra concentrazione atmosferica di sostanze dannose e risposta biologica. Attualmente, l'utilizzo dei licheni come bioindicatori è diffuso in quasi tutte le principali città dell'Europa centro-settentrionale e in molti Paesi tale tecnica è ormai diventata un'attività di routine. I licheni sono utilizzati come bioindicatori correlando determinate intensità di disturbo ambientale a variazioni del loro aspetto esteriore e della loro copertura. Le alterazioni indotte dall'inquinamento atmosferico sui licheni epifiti si possono manifestare a diversi livelli. A livello fisiologico, con generale depressione della fotosintesi (per danneggiamento della clorofilla), nonché un'evidente riduzione della fertilità. In situazioni di inquinamento particolarmente accentuato è frequente osservare anche la modificazione della permeabilità agli ioni delle membrane cellulari, come conseguenza del loro danneggiamento, e questo fatto ha implicazioni molto pesanti perché i licheni sono organismi peciloidrici, cioè sono normalmente in grado di sospendere il proprio metabolismo in seguito al disseccamento del citoplasma, ristabilendo un normale metabolismo quando l'acqua diventa di nuovo disponibile. Studi ecologici in campo e ricerche di laboratorio hanno dimostrato che l'anidride solforosa è tra gli inquinanti più dannosi per i licheni. La diversa sensibilità delle specie licheniche all'anidride solforosa è imputabile a diversi fattori: superficie disponibile per gli scambi gassosi, velocità di idratazione e idrorepellenza del tallo, attività metaboliche, pH e capacità tamponante del substrato, presenza di sostanze detossificanti. A livello morfologico l'inquinamento atmosferico induce evidente scolorimento e modificazione della forma del tallo. In generale, avvicinandosi alle sorgenti inquinanti, si assiste ad un progressivo peggioramento delle condizioni di salute del lichene. A livello ecologico, si osserva a generale diminuzione della copertura di specie e alterazione delle comunità licheniche. In zone densamente

antropizzate si osserva spesso una modificazione della flora lichenica locale, legata alla riduzione del numero totale di specie e alla diminuzione del numero di individui appartenenti a ciascuna specie. Mentre le alterazioni morfologiche e fisiologiche sono impegnative da quantificare e non sempre di facile interpretazione, le variazioni ecologiche permettono di tradurre le risposte dei licheni in valori numerici, riferibili ai diversi livelli di inquinamento atmosferico.

E' importante precisare che i licheni considerati per la valutazione della biodiversità sono essenzialmente quelli epifiti, il che consente di limitare la variabilità di parametri ecologici indipendenti dall'inquinamento, quali tenori in basi o capacità idrica del substrato, assai variabili nei substrati litici. La biodiversità dei licheni epifiti ha dimostrato di essere un eccellente indicatore dell'inquinamento prodotto da sostanze gassose fitotossiche (Hawksworth e Rose 1970; Ferry et al. 1973; Nash e Wirth 1988; Richardson, 1992; Purvis, 2000; Van Dobben et al. 2001). I licheni rispondono con relativa velocità al peggioramento della qualità dell'aria e possono ricolonizzare in pochi anni ambienti urbani e industriali qualora si verificano dei miglioramenti delle condizioni ambientali, come evidenziato in molte parti d'Europa (Rose e Hawksworth 1981; Kandler e Poelt 1984; Seaward e Letrouit-Galinou 1991; Seaward 1997; Munzi et al. 2007). I licheni sono anche sensibili ad altri tipi di alterazioni ambientali, tra queste l'eutrofizzazione rappresenta uno degli esempi più conosciuti (Van Dobben e De Bakker 1996; Van Herk 1999; Frati et al. 2007). Essendo molto sensibili ai cambiamenti delle condizioni microclimatiche e alle attività di gestione forestale, i licheni sono stati usati anche per stimare la continuità ecologica delle foreste (Rose 1976; McCune 2000; Nascimbene et al. 2010; Giordani e al. 2012), e perfino per monitorare il cambiamento climatico (Insarov et al., 1999; Ellis et al. 2007).

Negli ultimi decenni sono stati proposti molti metodi che, utilizzando opportune scale di interpretazione, valutano attraverso i licheni la qualità dell'aria. A partire dagli anni '80 del secolo scorso in Svizzera, è stato sviluppato un modello oggettivo e riproducibile di bioindicazione sensibile all'effetto combinato degli inquinanti atmosferici, principalmente biossido di zolfo, ossidi di azoto e metalli pesanti. La verifica di 20 differenti tecniche utilizzate per il calcolo di indici di purezza atmosferica basate sulla biodiversità lichenica, ha evidenziato come i campionamenti effettuati con griglie di dimensioni fisse rappresentassero i migliori risultati, non richiedano nessuna assunzione riguardante la sensibilità delle specie ai singoli inquinanti (Amman et al. 1987; Liebendörfer et al. 1988; Herzig e Urech, 1991). Tale metodo è stato rapidamente adottato in molti paesi, specialmente Italia e Germania, spesso con l'introduzione di alcune modifiche metodologiche. Nelle modalità di approccio messe a punto in Svizzera, la dimensione della griglia variava rispetto al diametro del tronco, mentre in Italia e Germania sono state adottate dimensioni fisse, seppur differenti tra loro, permettendo in questo modo di utilizzare i dati di frequenza come una stima della diversità lichenica (Nimis et al. 1992; Badin e Nimis 1996). Dal 1987 sono stati realizzati centinaia di studi basati su questa metodica; gli studi di qualità dell'aria mediante licheni hanno trovato in Italia larga diffusione a partire dagli anni ottanta, in concomitanza con la ripresa dell'interesse per gli studi lichenologici e fino agli anni 2000 (Piccini e Salvati 1999). Le numerose indagini realizzate hanno riguardato centri urbani, territori comunali e provinciali (Nimis et al.

1991), zone di interesse naturalistico, e aree con presenza di attività antropiche alteranti (Nimis et al. 1990).

I risultati della ricerca scientifica e la diffusione dell'utilizzo dei licheni come bioindicatori ha consentito di compiere un importante passo verso la standardizzazione sia in Germania (VDI Guideline, Wirth 1995) sia in Italia (Nimis 1999a) e successivamente in Europa (Asta et al. 2002; CEN 2014a). A partire dalla fine degli anni 2000, anche in conseguenza alle efficaci misure di contenimento delle emissioni di inquinanti gassosi fitotossici quali l'SO<sub>2</sub>, l'applicazione della tecnica di bioindicazione tramite licheni si è rarefatta. Alcuni autori hanno anche messo in luce, in un contesto ambientale di riferimento mutato rispetto al passato, la difficoltà nel riferire con precisione i dati di biodiversità lichenica a quelli di qualità dell'aria, soprattutto in condizioni di inquinamento da gas fitotossici limitato (Giordani 2007)

## 2.3 LICHENI E BIOACCUMULO

Negli ultimi 40 anni la ricerca nel campo del biomonitoraggio tramite licheni è stata condotta su un ampio spettro di analiti inorganici ed organici bioaccumulati nel tallo (Garty 1993; Van der Wat e Forbes 2015).

La capacità di accumulo di inquinanti, soprattutto in relazione all'intrappolamento del particolato atmosferico intercettato sulla superficie del tallo (Bargagli e Mikhailova 2002), è fortemente influenzato dalla forma di crescita, che nella serie crostosa, foliosa, fruticosa, presenta un progressivo aumento della superficie di contatto con l'atmosfera. Oltre alla forma di crescita, la rugosità della superficie per la presenza di strutture vegetative, di propagazione, di riproduzione e di sostanze superficiali prodotti dall'attività metabolica del micobionte (e.g. pruina, costituita da cristalli di ossalato di Ca) può influire sull'intrappolamento del particolato. Ulteriori meccanismi di accumulo includono la diffusione di gas attraverso le membrane cellulari e processi di scambio cationico (Garty e Ammann 1987; Garty 2000). Il movimento di elementi in traccia all'interno del tallo è favorito sia dalla presenza di acqua sulla superficie del tallo (Nieboer et al. 1976), sia da interruzioni del cortex come pseudocifelle, sorali, pori e rotture traumatiche o predisposte per la dispersione di isidi e schizidi.

All'interno del tallo, l'assorbimento extracellulare dei metalli avviene mediante complessazione ionica dei cationi metallici con ligandi presenti sulla parete cellulare del micobionte, sia nel cortex sia nella medulla, secondo un processo di scambio cationico pH-dipendente, che è rapido e reversibile, essendo determinato dall'affinità chimica tra specifici contaminanti e specifici ligandi apoplastici carichi negativamente (Nieboer e Richardson 1980). Tra questi ultimi rivestono un ruolo primario i gruppi carbossilici dei polisaccaridi pectici che sono tra i costituenti della parete cellulare del micobionte (Sarret et al. 1998; Paul et al. 2003); sono rilevanti anche gruppi sulfidrilici e amminici delle proteine di interfaccia parete-membrana (Brown 1987), e gruppi ossidrilici e carbossilici di metaboliti secondari prodotti dal micobionte e presenti nel cortex e nella medulla, noti come acidi lichenici (e.g. acidi norstictico e psoromico, Purvis et al. 1987, 1990). Questi sono composti aromatici di derivazione depsidica, alcuni dei quali hanno notevole rilevanza in campo farmacologico e cosmetico (e.g. acidi giroforico, lecanorico, usnico, si veda e.g. Cocchietto et al. 2002) e che sono importanti quali caratteri diacritici per l'identificazione tassonomica (Hutchinson et al. 1996). Due ulteriori gruppi di metaboliti secondari sono ancora gli



acidi organici e le melanine. Tra i primi il composto più importante dal punto di vista dei processi di accumulo extracellulare è l'acido ossalico, che può formare precipitati fortemente insolubili (per es. con il calcio) che si accumulano soprattutto a livello medullare e corticale, formando depositi molto imponenti (Salvadori e Tretiach 2002; Giordani et al. 2003). Le melanine, polimeri costituiti da unità fenoliche (endogene ed esogene), possono svolgere funzioni antimicrobiche, antiossidanti e foto protettive, ma sono anche capaci di chelare alcuni elementi, tra cui il più importante è il ferro.

A livello intracellulare l'immobilizzazione di cationi può avvenire mediante complessazione da parte di componenti simplastiche di entrambi i partner simbiotici. Si tratta di un processo lento, selettivo e controllato da canali ionici posti sulle membrane cellulari. Riguarda solo alcuni elementi metallici in grado di competere con elementi e molecole fisiologiche (e.g. Ca, Mg, ammonio, nitrato). Una volta nel simplasto il sequestro dei cationi avviene ad opera di ligandi come i gruppi fosfato, presenti come polimeri lineari condensati in forma di granuli di riserva del P comune nelle crittogame (Giordani e Brunialti 2001), o come polifosfati legati da legami fosfoanidride ad alta energia (e.g. ATP) presenti nelle zone di attiva crescita del tallo (margini, strutture di propagazione e di riproduzione) in entrambi i simbionti (Paul et al. 2003). Infine, è stata osservata la sintesi di fitochelatine, peptidi relativamente ricchi in residui cisteinici capaci di complessare cationi metallici, in risposta alla presenza di contaminanti quali Cd, Cu, Pb e Zn, quale meccanismo di detossificazione (Pawlik-Skowrońska et al. 2002, 2006; Bačkor e Loppi 2009). Eccezionalmente, l'accumulo avviene in specifici organuli cellulari, come nel caso del mercurio che tende a concentrarsi a livello dei plastoglobuli dei cloroplasti del fotobionte, per la sua affinità con lo zolfo dei solfolipidi che compongono gran parte delle membrane tilacoidali (ined.).

La dotazione di sostanze lipofile tipica del micobionte favorisce l'adsorbimento di molecole idrofobiche, quali i composti organici semi-volatili (SVOCs); il loro trasporto intracellulare è controllato metabolicamente (Branquinho et al. 1999; Branquinho 2001). Gli inquinanti organici, tipicamente lipofili, vengono maggiormente accumulati a partire dalle deposizioni secche (Branquinho et al. 1999; 2001).

Date le peculiarità morfologiche e fisiologiche dei licheni, la composizione elementale del tallo generalmente riflette la composizione chimica dell'atmosfera circostante (Bargagli 1998, Nash 2008). Nel caso dei metalli, la correlazione tra il contenuto elementale nei talli e le concentrazioni atmosferiche è stata più volte osservata (e.g. Kansanen e Venetvaara 1991). Tuttavia tale relazione è altamente dipendente dal contesto ambientale di riferimento, poiché talli esposti a livelli simili di concentrazione di inquinanti, possono produrre risultati molto diversi in termini di accumulo, in relazione allo stato metabolico del tallo (Godinho et al. 2008), alla natura, stato chimico-fisico ed effetti non additivi degli inquinanti considerati (Wellburn et al. 1981; Balaguer e Manrique 1991), alle condizioni meteo-climatiche (Adamo et al. 2003; Ayrault et al. 2007; Adamo et al. 2008) e all'interazione tra inquinanti e condizioni meteo-climatiche (Garty 2000; Garty et al. 2007).

I licheni sono stati utilizzati in studi di bioaccumulo in diversi contesti ambientali (Conti et al. 2004), inclusi ambienti prossimo-naturali (Loppi 2014; Nascimbene et al. 2014), sistemi agricoli (Will-Wolf et al. 2015) ed aree urbane (Adamo et al. 2003; Basile et al. 2008) e industriali (Purvis et al. 2000; Godinho et al. 2008), o misti

(Tretiach e Baruffo 2001, Capozzi et al. 2016), con campagne di monitoraggio mirate su sorgenti di emissioni puntiformi (Tretiach et al. 2011) o investigazioni a scala locale o regionale (Sawidis et al. 1995; Nimis et al. 2000) considerate strumenti utili per la valutazione di impatto ambientale. Negli studi di bioaccumulo degli inquinanti inorganici sono stati primariamente utilizzati licheni epifiti foliosi e fruticosi (e.g. Loppi e Pirintsos 2003; Forbes et al. 2009; Adamo et al. 2003; Dongarra et al. 1998; Lippo et al. 1995; Mendil et al. 2009). Oltre all'ampia distribuzione e l'elevata superficie di contatto con l'atmosfera, l'utilizzo di queste forme di crescita è privilegiato per ragioni pratiche legate alla facilità di prelievo dei talli dal substrato, anche se non mancano applicazioni basate su specie crostose e squamulose (e.g. Pawlik-Skowronska e Bakor 2011), soggette tuttavia a maggior rischio di contaminazione nella fase di prelievo dei campioni. Nel caso di specie epilittiche, come dimostrato per alcune specie di Parmeliacee (e.g. Sarret et al. 1998), non è possibile escludere l'arricchimento di elementi minerali dovuto all'assorbimento a partire dal substrato roccioso o dal suolo. La bioconcentrazione di metalli è specie-specifica, come dimostrato per diverse specie e in diverse regioni geografiche (Mendil et al. 2009), così come il contenuto di azoto, come dimostrato in *Parmelia sulcata* rispetto a *Xanthoria parietina* e *Physcia* spp. (Boltersdorf et al. 2014).

Negli studi effettuati in Italia sono state utilizzate come bioaccumulatori *in situ* diverse specie foliose. Le più utilizzate sono certamente *Xanthoria parietina*, *Flavoparmelia caperata* e *Parmelia sulcata*. Grazie al lungo ciclo vitale e bassi tassi di crescita, che permettono di determinare con buona approssimazione l'età del tallo o delle sue porzioni marginali (Conti e Cecchetti 2001), queste specie consentono di accertare la risposta a esposizioni acute o prolungate all'inquinamento atmosferico, riferendo l'esposizione a specifici periodi di tempo. Ulteriori caratteristiche che ne favoriscono l'impiego includono l'ampia distribuzione sul territorio nazionale e l'adeguata densità e stabilità delle popolazioni, che assicurano generalmente la disponibilità di materiale per la raccolta di campioni. Tuttavia esperienze precedenti hanno dimostrato come sia spesso difficile impostare campagne di biomonitoraggio con licheni autoctoni basate sull'uso di una singola specie, soprattutto in aree vaste ed ecologicamente eterogenee (e.g. Minganti et al. 2003; Nimis et al. 2001; Tretiach 2014, 2015). Inoltre, differenze interspecifiche nella capacità di accumulo (Nimis et al. 2001), osservate anche tra specie tassonomicamente affini e coesistenti nelle medesime condizioni ambientali (Tretiach e Baruffo 2001) possono complicare l'interpretazione dei risultati, in particolare considerando il peso relativo degli effetti dovuti a caratteristiche intrinseche alla specie e di quelli relativi a possibili confondimenti ambientali.

Quando specie autoctone adatte non sono disponibili *in situ*, è possibile ricorrere all'utilizzo di trapianti lichenici. Vengono quindi selezionate specie tolleranti alle condizioni ambientali nell'area di esposizione, in genere tra quelle più abbondanti in aree prossimo-naturali (Sloof 1995; Frati et al. 2005; Ayrault et al. 2007). Si noti come i fattori potenzialmente stressanti per le specie trapiantate includano non solo l'inquinamento atmosferico, ma anche condizioni restrittive dal punto di vista del microclima dei siti di esposizione, che, rispetto ai siti di origine delle popolazioni licheniche, può essere notevolmente più arido e caldo, come nel caso degli effetti "isola di calore" in aree urbane e industriali (LeBlanc e De Sloover 1970; Munzi et al. 2007). La tecnica dei trapianti, applicata nella maggior parte dei casi per il

biomonitoraggio delle deposizioni di elementi in traccia, non va tuttavia considerata come una mera alternativa all'uso di specie autoctone in aree caratterizzate dall'impovertimento delle popolazioni licheniche. Al contrario, tale tecnica presenta due indubbi vantaggi (Bargagli 1998; Frati et al. 2005; Ayrault et al. 2007): a) i campioni lichenici possono essere ripetutamente esposti per periodi noti e seguendo uno schema di localizzazione sul territorio basato su una pianificazione razionale, b) è possibile ricavare tassi di arricchimento del contenuto elementale dei campioni per differenza rispetto ai valori precedenti all'esposizione. Negli ultimi anni, l'attendibilità della tecnica dei trapianti è stata studiata con particolare attenzione agli aspetti metodologici e operativi, inclusi i protocolli di trattamento dei campioni nella fase immediatamente precedente alla determinazione quantitativa degli analiti (Adamo et al. 2007; Adamo et al. 2008) e l'interpretazione dei risultati post-esposizione (Frati et al. 2005; Tretiach et al. 2007). Nella maggior parte di questi studi metodologici, la specie modello utilizzata è stata *Pseudevernia furfuracea*, un macrolichene fruticoso-cespitoso, meso-xerofilo e fotofilo, ampiamente diffuso nelle regioni temperate (Rikkinen 1997; Smith 2009) principalmente su scorza acida, non eutrofizzata (Nimis e Martellos 2002). *P. furfuracea* è tra le specie più studiate (Quevauviller et al. 1996; Bari et al. 2001; Vingiani et al. 2004; Tretiach et al. 2005; Giordano et al. 2013; Nascimbene et al. 2014) e, con *Evernia prunastri*, più utilizzate in lavori di bioaccumulo basati su trapianti (Brunialti e Frati 2014). Per questa specie, inoltre, sono in corso di pubblicazione i risultati di una campagna di raccolta su scala nazionale volta a determinare i valori background (i.e. valori medi di contenuto elementale in condizioni prossimo-naturali, vedi *supra*) per diversi contesti ambientali e la loro variabilità intraspecifica, per la maggior parte degli elementi oggetto di studi di biomonitoraggio. Infatti, il contenuto elementale, anche in talli della medesima specie esposti a simili livelli di contaminanti, può variare, oltre che in base allo stato metabolico e alla morfologia del tallo, in funzione del contesto ambientale di riferimento, con determinanti causali sia a macroscale, e.g. tipologia di substrato litologico (Agnan et al. 2014, 2015), regime meteo-climatico (Jovan et al. 2007; Purvis et al. 2007), uso del suolo (Conti et al. 2004; Sorbo et al. 2008), sia a microscale, e.g. posizione su rami o fusto degli alberi (Adamo et al. 2008), altezza dal piano campagna, direzione cardinale (Paoli et al. 2013).

Per la determinazione quantitativa degli analiti nei campioni lichenici, sono state impiegate una varietà di tecniche strumentali, che includono la spettrometria plasma-massa (ICP-MS), plasma-emissione ottica (ICP-EOS), ad assorbimento di raggi-X, ad assorbimento atomico a fiamma (AA). In Tabella 1 si riportano alcuni esempi di inquinanti inorganici determinati in studi di bioaccumulo mediante licheni *in situ* in diversi Paesi, con elencate le tecniche strumentali utilizzate per l'estrazione e determinazione analitica.

Nella fase analitica, uno dei fattori determinanti per il risultato in termini di valori di concentrazione è il processo di estrazione (mineralizzazione nel caso dei metalli) dei contaminanti dalla matrice biologica. Uno dei metodi più utilizzati (Tabella 1) è la digestione in microonde del campione, essiccato, macinato e preparato in soluzione acida. Il tipo di soluzione acida impiegata può incidere significativamente sulla percentuale di recupero dei contaminanti inorganici (Baffi et al. 2002; Bettinelli et al. 2002), e d'altra parte, in letteratura, sono riportati trattamenti anche notevolmente

diversi. In Tabella 2 si riportano esempi di trattamenti di digestione acida in campioni di licheni e, per confronto, in muschi.

Mentre i licheni sono tradizionalmente applicati come biomonitors di inquinanti inorganici da diverse decadi ([Garty 2001](#)), la loro applicazione come bioaccumulatori di inquinanti organici è più recente. Idrocarburi policiclici aromatici (PAH), fenoli, diossine e furani (PCDD/Fs) e policlorobifenili (PCBs) sono tra gli inquinanti organici più spesso oggetto di studio ([Garty et al. 1983](#); [Villeneuve e Holm 1984](#); [Bacci et al. 1986](#); [Migaszewski et al. 2002](#); [Guidotti et al. 2003](#); [Augusto et al. 2007](#); [Kodnik et al. 2015](#)) per i quali sono state impiegate diverse specie licheniche ([Shukla et al. 2012](#); [Blasco et al. 2006](#); [Augusto et al. 2009](#); [Schrlau et al. 2011](#)). In Tabella 3 sono riportati esempi degli analiti organici studiati mediante licheni, completi delle tecniche utilizzate per la preparazione dei campioni, dei metodi di determinazione analitica, e delle concentrazioni riscontrate. Come nel caso dei muschi, anche per i licheni si ritiene che l'accumulo degli inquinanti organici avvenga secondo processi passivi a partire dalle deposizioni atmosferiche secche e umide ([Sloof 1995](#)). Secondo l'ipotesi più accreditata, i metaboliti lipidici prodotti dalle cellule della superficie esterna del tallo agirebbero con le stesse modalità osservate per la cuticola delle piante superiori ([Oksanen et al. 2006](#)). [Bauer e Schönherr \(1992\)](#) e [Baur et al. \(1997\)](#) hanno dimostrato che i tassi di diffusione degli inquinanti organici persistenti (POPs) pesanti sono inferiori rispetto a quelli dei POPs a basso peso molecolare, da cui l'osservazione che i POPs pesanti sono più frequentemente associati con il particolato adsorbito sulla superficie del tallo. [Augusto et al. \(2013\)](#) riportano che le concentrazioni di PCDD/Fs rimangono stabili anche dopo periodi prolungati di elevata umidità relativa in seguito a precipitazioni o nebbie, indicando che i POPs possono essere incorporati nel tallo e non sono facilmente dilavati. Analoghe dinamiche sono attese, pur se non ancora dimostrate, per altre classi di inquinanti organici ([Kylin et al. 2012](#); [Augusto et al. 2013](#)).

**Tabella 1.** Esempi di inquinanti inorganici determinati analiticamente in studi di bioaccumulo basati su licheni *in situ*.

Specie	Paese	Analiti	Quantità campione	Estrazione	Analisi	Riferimento bibliografico
<i>Parmelia sulcata</i>	Olanda	Al, As, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hf, Hg, I, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Pb, Sb, Sc, Se, Sr, Ti, U, V, W, Yb, Zn	0.03 - 0.1 g	n.d.	INAA	De Bruin 1990
<i>Hypogymnia physodes</i>	Finlandia	Cr, Ni	0.2 l volume	Digestione umida	ICP-OES	Kansanen et al. 1991
<i>Hypogymnia physodes</i>	Finlandia	Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Talli interi	Digestione umida	ICP-OES	Lippo et al. 1995
<i>Hypogymnia physodes</i>	Slovenia	Ag, As, Ba, Br, Ce, Cd, Co, Cr, Cs, Fe, Ga, Hf, Hg, K, La, Mo, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Sr, Sm, Tb, Th, U, W, Zn	0.1 - 0.2 g	N/A	INAA	Jeran et al. 1996
<i>Parmelia</i> spp.	Italia	Au, As, Ba, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, Hf, K, Mo, Na, Rb, Sb, Sb, Sc, Th, U, Zn, Cu, Pb, Ni, Mn, Sr, V, P, Mg, Ti, Al, Y	n.d.	n.d.	INAA, ICP	Dongarra et al. 1998
<i>Flavoparmelia caperata</i>	Italia	Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg Mn, Ni, Pb, Zn	n.d.	Digestione ad alta pressione	FAAS, GFAAS	Loppi e Printsos 2003
<i>Parmotrema austrosinense</i>	Sud Africa	Cr, Co, Mn, Ni, Pb, , Sn, Zn	0.25 g	Microonde	FAAS	Forbes et al. 2009
<i>Flavoparmelia caperata</i> <i>Physcia adscendens</i> <i>Physcia stellaris</i> <i>Ramalina polymorpha</i> <i>Xanthoria parietina</i>	Turchia	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	1 g	Microonde	FAAS, GFAAS	Mendil et al. 2009
<i>Parmelia sulcata</i>	Ghana	Al, As, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Sb, Th, V	0.2 g	n.d.	INAA	Boamponsem et al. 2010
<i>Cladonia furcata</i> <i>Hypocenomyce scalaris</i> <i>Lepraria incana</i>	Polonia	Mn, Pb	0.005 - 0.02 g	Ultrasuoni	FAAS	Pawlik-Skowronska et al. 2011
<i>Xanthoria parietina</i>	Turchia	Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Ni, Pb, S, Ti, Ti, V, Zn	1 g	Digestione umida	ICP-MS	Demiray et al. 2012
<i>Parmelia sulcata</i> <i>Physcia adscendens</i> <i>Physcia tenella</i> <i>Xanthoria parietina</i>	Germania	isotopi N	3 - 4 mg	n.d.	Analizzatore elementare accoppiato con rapporto isotopico MS	Boltersdorf et al. 2014

n.d., non disponibile; FAAS, spettrometria ad assorbimento atomico a fiamma; ICP-OES, spettrometria ad emissione ottica - plasma induttivamente accoppiato; ICP-MS, spettrometria di massa - plasma induttivamente accoppiato; INAA, analisi ad attivazione strumentale di neutroni; GFAAS, spettrometria ad assorbimento atomico a fornetto di grafite.

**Tabella 2.** Esempi di trattamenti di digestione acida in microonde per l'estrazione di inquinanti inorganici in organismi biomonitors

Biomonitor	Soluzione acida	Quantità campione	Riferimento bibliografico
Muschi	4 ml HNO <sub>3</sub> (65%), 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	0.15-0.2 g	Kunert et al. 1999
Licheni	Mix di HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and HF (q.tà non specificate)	0.05-0.1 g	Doucet et al. 2001
Licheni	HNO <sub>3</sub>	0.15 g	Loppi et al. 2004
Licheni	3 ml HNO <sub>3</sub> , 3 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 0.8 ml HF, 2 ml H <sub>2</sub> O deionizzata	0.25g	Forbes et al. 2009
Licheni e muschi	6 ml HNO <sub>3</sub> (65%), 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%), 2 ml H <sub>2</sub> O	1 g	Mendil et al. 2009
Muschi	n.d.	n.d.	Gonzalez-Miqueo et al. 2010
Muschi	2.5 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%), 5 ml HNO <sub>3</sub> (65%)	0.25 g	Buonocore et al. 2013
Muschi	HNO <sub>3</sub> and HF (2:1, v/v)	n.d.	de Nicola et al. 2013

Una delle limitazioni principali per l'utilizzo di licheni come biomonitors è consistita nel fatto che per molto tempo sono mancati studi in grado di tradurre le concentrazioni di analiti organici riscontrate nei licheni in valori equivalenti di concentrazione atmosferica. Riguardo agli inquinanti organici, un recente studio di [Augusto et al. \(2013\)](#) ha fornito un contributo rilevante, riportando un confronto tra le concentrazioni di PAH riscontrate in campioni di licheni e quelle misurate da un campionatore attivo all'aria aperta. Questo studio ha mostrato una correlazione significativa per le concentrazioni totali di 16 PAH ad alto peso molecolare classificati dall'agenzia di protezione ambientale americana (EPA), incluso il benzo[a]pirene. L'osservazione di una fluttuazione stagionale consistente nel profilo di PAH suggerisce che la stagione selezionata per la raccolta dei campioni lichenici sia un fattore importante da considerare nella pianificazione di campagne di monitoraggio e dovrebbe quindi essere mantenuta il più possibile costante ([Augusto et al. 2013](#)), preferendo decisamente quella invernale a quella estiva ([Kodnik et al. 2015](#)).

A conferma dello stato ancora preliminare dell'uso dei licheni come bioaccumulatori di inquinanti organici, i risultati disponibili in letteratura sulle diverse tecniche sono spesso contestato-dipendenti, se non discordanti. Ad esempio, secondo [Jensen \(1990\)](#), che ha studiato i SVOCs in aghi di pino in Scandinavia confrontando i risultati con quelli ottenuti in muschi e licheni, questi ultimi non sarebbero in grado di accumulare i SVOCs più volatili, come l'esa-clorocicloesano (HCH), a livelli apprezzabili. Le concentrazioni di HCH nei campioni lichenici mostravano infatti una variabilità erratica rispetto al dato misurato negli aghi di pino, che invece è risultato più riproducibile, soprattutto in seguito a precipitazioni meteoriche. L'autore suggerisce quindi che i licheni non siano utili per lo studio dell'HCH poiché, essendo soggetti a dilavamento, non sarebbero in grado di accumulare a sufficienza questi specifici analiti ([Jensen 1990](#); [Kylín et al. 2012](#)). In contrasto con queste osservazioni, [Augusto \(2010\)](#) suggerisce che i licheni siano capaci di un accumulo di PAH maggiore rispetto al suolo e agli aghi di conifere, come confermato anche da uno studio di [Schrlau et al. \(2011\)](#) sul confronto tra licheni, aghi di conifere e muschi e da uno studio di [Migaszewski et al. \(2002\)](#) sul confronto tra talli lichenici e corteccia del substrato arboreo. In quest'ultimo caso, le concentrazioni erano coerenti tra diversi campioni lichenici, della stessa specie, nonostante questi fossero prelevati da diverse specie arboree.

**Tabella 3.** Esempi di studi di bioaccumulo di inquinanti organici in licheni.

Specie	Paese	Analiti	Quantità campione	Estrazione	Analisi	Riferimento bibliografico
<i>Xanthoria parietina</i>	Portogallo	PCDD/Fs	n.d.	Solventi	GC-HRMS	Augusto et al. 2004
<i>X. parietina</i>	Portogallo	PCDD/Fs	n.d.	Soxhlet	HRGC/HRMS	Augusto et al. 2007
<i>Parmotrema hypoleucinum</i>	Portogallo	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-FLD-DAD/V-UV	Augusto et al. 2009
<i>Parmotrema hypoleucinum</i>	Portogallo	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-FLD-DAD/V-UV	Augusto et al. 2010
<i>Parmotrema hypoleucinum</i>	Portogallo	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-FLD-DAD/V-UV	Augusto et al. 2013
<i>Remototrachyna awasthii</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC	Bajpai et al. 2013a
<i>Remototrachyna awasthii</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC	Bajpai et al. 2013b
<i>Parmelia sulcata</i>	Spagna	PAH	0.2 g	DSASE	GC-MS	Blasco et al. 2006
<i>Parmelia sulcata</i>	Spagna	PAH	0.2 g	DSASE	GC-MS	Blasco et al. 2007
<i>Evernia prunastri</i>	Spagna	PAH	0.2 g	DSASE	GC-MS	Blasco et al. 2008
<i>Evernia prunastri</i>	Spagna	PAH	0.2 g	DSASE	GC-MS	Blasco et al. 2011
<i>Lobaria pulmonaria</i>						
<i>Parmelia sulcata</i>						
<i>Pseudevernia furfuracea</i>						
<i>Ramalina farinacea</i>						
<i>Usnea</i> sp.						
<i>Usnea antarctica</i>	Antartide	PAH	n.d.	Soxhlet	GC-MS	Cabrerizo et al. (2012)
<i>X. parietina</i>	Francia	PCDD/Fs, PCB	n.d.	n.d.	GC-HRMS	Denys et al. 2012
<i>Xanthoria parietina</i>	Spagna	PAH	0.2 g	DSASE	GC-MS	Domeño et al. 2006
<i>Pyxine coralligena</i>	Venezuela	PAH	2 g	Ultrasuoni	HPLC-FLD-DAD	Fernandez et al. 2011
<i>P. furfuracea</i>	Italia	PAH	2 g	Ultrasuoni	GC-MS	Guidotti et al. 2003 2009
<i>Hypogymnia physodes</i>	Polonia	PAH	n.d.	n.d.	n.d.	Jóźwiak et al. (2012)
<i>P. furfuracea</i>	Italia (PN)	PAH	0.6 g	Solventi	GC-MS	Kodnik et al. (2015)
<i>Hypogymnia physodes</i>	Polonia	PAH	n.d.	Soxtec liquido-solido	GC-MS	Migaszewski et al. 2002
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Italia	PAH	0.6-0.8 g	Soxhlet	GC-MS	Nascimbene et al. 2014
<i>P. furfuracea</i>	Italia (RM)	PAH	2 g	Ultrasuoni	GC-MS	Protano et al. (2014)
<i>Dirinaria picta</i>	Malesia	PAH	2 g	Soxhlet	GC-MS	Samudin et al. (2013)
<i>Rinodina sophodes</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC	Satya et al. (2012)
<i>X. parietina, Ramalina canariensis</i>	Portogallo	PCOD/Fs	n.d.	Soxhlet	HRGC/HRMS	Schrlau et al. 2011
<i>Phaeophyscia hispidula</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-V-UV	Shukla et al. 2009
<i>Pyxine subcinerea</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-V-UV	Shukla et al. 2012
<i>Dermatocarpon vellereum</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-V-UV	Shukla et al. 2013
<i>Rinodina sophodes</i>	India	PAH	2 g	Soxhlet	HPLC-V-UV	Upreti et al. 2012
<i>9 specie</i>	USA occidentali	PAH	2 g	DSASE	GC-MS	Usenko et al. (2010)
<i>Cladonia alpestris</i>	Svezia	PCB, DDT, DDE	n.d.	Soxhlet	GC-ECD	Villeneuve et al. 1984

n.d., non disponibile; DSASE, estrazione assistita con sonicazione dinamica; GC-MS, gas cromatografia - spettrometria di massa; HPLC-FLD-DAD/V-UV, cromatografia liquida ad alte prestazioni - rivelatore di fluorescenza - rivelatore ad array di diodi / rivelatore visibile-ultravioletto; HPLC-V-UV, cromatografia liquida ad alte prestazioni - rivelatore visibile-ultravioletto; GC-HRMS, gas cromatografia ad alta risoluzione / spettrometria di massa ad alta risoluzione; GC-ECD, gas cromatografia - rivelatore a cattura di elettroni.

Questi risultati forniscono un'evidenza promettente sulle potenzialità dell'uso dei licheni come biomonitori per lo studio degli inquinanti organici, specialmente in caso di terreni difficilmente accessibili con le ingombranti e costose apparecchiature per la misura strumentale delle concentrazioni atmosferiche. Come nel caso degli inquinanti inorganici, sono state osservate differenze interspecifiche di accumulo sia nel caso di PCDD/Fs (Augusto et al. 2009) sia per gli PAH (Blasco et al. 2011). In entrambi i casi sono state osservate differenze significative, che evidenziano l'importanza di una selezione appropriata della specie lichenica e di un sistema efficiente di campionamento finalizzato a minimizzare la variabilità del dato dovuta a fattori biologici. Da un confronto tra licheni foliosi e fruticosi, questi ultimi sono risultati più efficaci nell'assorbimento di POPs a basso peso molecolare, in virtù del loro elevato rapporto tra superficie esposta e volume, mentre nei licheni foliosi sarebbe favorito l'assorbimento di inquinanti organici ad alto peso molecolare (Augusto 2009; Augusto et al. 2009; Schrlau et al. 2011; Blasco et al. 2011). In generale, al di là della forma di crescita considerata, i licheni mostrano profili simili di POPs, con contenuti maggiori di PAH a due e quattro anelli (Migaszewski et al. 2002; Guidotti 2003; Blasco et al. 2006; Blasco et al. 2008; Shukla et al. 2009; Augusto 2010; Augusto et al. 2013), tra i quali fenantracene, naftalene, fluorantene e benzo[a]antracene sono le molecole a concentrazione più elevata (Augusto 2010; Blasco et al. 2011). Nel caso di diossine e furani, i profili sono spesso dominati da tetracloro-dibenzo-diossine (TCDD) e policloro-dibenzo-p-diossine (PCDD) e da policloro-dibenzo-furani (PCDF) (Augusto 2004; Augusto et al. 2007; Augusto et al. 2009).

In un recente studio, Kodnik et al. (2015) hanno investigato il contenuto di PAH in trapianti di *Pseudevernia furfuracea* esposti in due periodi stagionali diversi in 40 siti localizzati nel pordenonese, in un'area eterogenea per uso del suolo. In particolare, lo studio era finalizzato all'identificazione delle sorgenti primarie di emissione (attività industriali, traffico veicolare, riscaldamento domestico), alla valutazione degli effetti delle condizioni meteorologiche sulla capacità dei licheni di accumulare PAH, e all'accertamento della variazione stagionale della distribuzione di questi inquinanti nei siti di esposizione. Sono state osservate importanti differenze stagionali, imputate sia a modificazioni nell'intensità delle emissioni, sia a variazioni stagionali delle condizioni ambientali che interferiscono con la cinetica e la dinamica di trasporto e deposizione degli PAH, e con la loro degradazione. Questa, in particolare, è stimolata da alte temperature e irraggiamento UV, condizioni ossidanti, che differiscono non solo in base alla stagionalità, ma anche tra diverse località. Questo studio ha fornito indicazioni di notevole rilevanza sull'importanza della stagionalità nella pianificazione di campagne di biomonitoraggio degli inquinanti organici. Infatti, studi condotti nella stagione più calda, al di là della corretta descrizione della distribuzione territoriale del carico di questi inquinanti, certamente conducono a sottostime del carico potenziale di PAH, che tipicamente si osserva nei periodi freddi. Diversamente, studi condotti sulla base di campioni esposti in diverse stagioni nelle medesime aree possono condurre alla sovrastima della variabilità stagionale delle emissioni, se non viene tenuto in considerazione l'effetto delle condizioni climatiche sull'intercettazione e la liberazione del particolato atmosferico contenente PAH e sulla degradazione di queste molecole. Gli autori, infine, suggeriscono che, almeno a latitudini intermedie, il periodo invernale sia quello



favorito per il rilevamento dei massimi livelli di PAH in una data area, in ragione della minima degradazione fotochimica e termica e della corrispondente massima attività delle potenziali sorgenti di emissione. Indagini condotte nel periodo estivo possono essere preferibili per il monitoraggio dei prodotti derivati dall'ossidazione degli PAH, che includono specie chimiche epossidiche, endoperossidiche, idrossidiche, chinoni, dioni, ecc. (Chu et al. 2010).

## 2.3 I MUSCHI COME BIOMONITORS

L'utilizzo di muschi come biomonitors è basata sull'ipotesi che questi organismi, possedendo peculiari forme di crescita, morfologia e ultrastruttura, forniscono potenzialmente performance migliori rispetto ad altri organismi, tra cui gli stessi licheni (Kansanen Venetvaara 1991). Su questo punto esistono tuttavia evidenze contrastanti, che, a parità di esposizione e condizioni ambientali di riferimento, indicano concentrazioni maggiori in licheni rispetto a muschi *in situ* (Lippo et al. 1995), ma valori maggiori in *moss-bags* rispetto a *lichen-bags* (Adamo et al. 2007).

I muschi sono organismi vegetali non vascolari privi di veri e propri fiori (crittogame) classificate nella divisione Bryophyta. Il loro ciclo vitale presenta evidente alternanza di generazioni, con predominio della fase aploide (gametofito). Le spore, germinando, producono un protonema filamentoso, ramificato, che per lo più ha vita effimera e degenera dopo aver dato origine ai gametofori, che sono la parte cormoide del gametofito, quella che costituisce la piantina del muschio adulta. Raramente un protonema produce un solo gametoforo, in genere ne forma parecchi ed è per questa ragione che di solito i Muschi crescono a ciuffi. A maturità le piantine sono costituite da un fustino semplice o ramificato, epigeo, con numerosi filloidi ricchi di clorofilla e fotosintetizzanti, a disposizione generalmente tristica; nella porzione basale, talvolta rizomatosa, organi filamentosi (rizoidi) svolgono la funzione di attacco al substrato. Come in tutte le Briofite, il gametofito porta i gameti, quelli femminili, formati entro archegoni e quelli maschili entro anteridi. Questi organi sessuali possono inoltre trovarsi sul medesimo individuo (specie omotalliche), ovvero gli anteridi su uno e gli archegoni su un altro (specie eterotalliche). Lo sporofito o sporogonio, che è sempre unito al gametofito, origina dall'oosfera fecondata dagli anterozoidi, ciliati e mobili, e consta di un filamento (seta) e di una capsula (urna) variamente foggiate (poligonale, sferica, ellissoideale), chiusa da un coperchio (opercolo) e sormontata da una cuffia (caliptra) di forma e consistenza varie. Nella capsula maturano le spore che, liberate per l'apertura della stessa, germinano in un protonema e ricominciano il ciclo. La moltiplicazione del gametofito può tuttavia avvenire per frammentazione dello stesso o per propaguli prodotti al margine dei filloidi o alla sommità del fusticino (Shaw e Goffinet 2000).

I muschi sono componenti normali della vegetazione a tutte le latitudini, costituendo spesso fitti agglomerati che talvolta rivestono muri, rocce, tronchi, o che formano soffici tappeti sul terreno, in genere (ma non esclusivamente) in luoghi umidi e ombrosi; alcune specie sono acquatiche; alcune specie resistono tuttavia a prolungata siccità e alcune specie sono xerofile (Smith 2012). I muschi vengono suddivisi in due categorie principali a seconda della posizione degli organi sessuali, situati alla sommità del fusticino nei muschi acrocarpi e delle ramificazioni in quelli pleurocarpi. Questa differenza influenza la forma di crescita, cosicché i muschi

pleurocarpi sono prostrati e fittamente ramificati, mentre gli acrocarpi hanno uno sviluppo più marcatamente verticale, leggermente ramificato, e sono generalmente più tolleranti alla siccità e all'inquinamento atmosferico (Fabure e tal. 2010). I muschi hanno un'ampia distribuzione e si ritrovano dal livello del mare ad alcune delle massime altitudini occupati da organismi vegetali. Come i licheni, i muschi non possiedono sistema radicale, mentre hanno una cuticola poco sviluppata e i fasci vascolari di trasporto sono in genere assenti, con alcune notevoli eccezioni (de Nicola et al. 2013). La loro principale fonte di approvvigionamento di nutrienti è quindi l'atmosfera, anche se in alcuni casi il loro contenuto elementale può essere arricchito da apporti derivanti dal substrato di crescita, dovuti alla risalita per capillarità dell'acqua e degli elementi in essa disciolti (Berg e Steinnes 1997).

Dotati di un elevato rapporto tra superficie esposta e massa (Adamo et al. 2007; de Nicola et al. 2013), i muschi sono soggetti a facile penetrazione di minerali, acqua e sostanze inquinanti per scambio cationico (Uyar et al. 2007). I principali fattori che influenzano l'accumulo di contaminanti nei muschi sono la quantità e la tipologia delle deposizioni atmosferiche (Spagnuolo et al. 2013), così come la solubilità in acqua delle diverse specie chimiche e le condizioni meteorologiche (Gonzalez-Miqueo et al. 2010). Le capacità di scambio cationico sono importanti per l'assorbimento di inquinanti inorganici, in particolare metalli, mentre la capacità di assorbire molecole di grandi dimensioni è fondamentale per l'accumulo di inquinanti organici (Wegner et al. 1992). Campioni di muschi antartici sono stati utilizzati come biomonitors per valutare le deposizioni di POPs e PAH (Colabuono et al. 2015). È interessante notare come sia stata rilevata una progressiva diminuzione delle concentrazioni di questi inquinanti nei campioni di muschi per un periodo di 8 mesi dopo un incendio avvenuto nella stazione antartica brasiliana, indicando in questi organismi la presenza di possibili meccanismi di detossificazione.

Negli studi di bioaccumulo si utilizzano più frequentemente muschi pleurocarpi per diverse ragioni. In primo luogo, il loro facile isolamento dal substrato minimizza possibili contaminazioni da particelle di terreno (Spagnuolo et al. 2009; de Nicola et al. 2013); inoltre, grazie alla loro crescita lenta e alla notevole superficie di contatto con l'atmosfera garantita dall'elevato ordine di ramificazione, le concentrazioni di metalli accumulati sono maggiori rispetto agli acrocarpi, agevolando la fase di analisi chimica quantitativa e riducendo il peso relativo di piccole quantità di contaminazione che possono comunque verificarsi (Berg e Steinnes 1997). Nelle procedure di campionamento, viene posta attenzione sulla posizione dei muschi da cui si prelevano i campioni in relazione alla loro micro-localizzazione. Gli individui che crescono al suolo sono generalmente raccolti in zone relativamente lontane dalla chioma degli alberi, pertanto non riflettono le deposizioni sotto chioma. In termini di accumulo di metalli, i muschi hanno dimostrato di riflettere le tendenze temporali della deposizione atmosferica su periodi più lunghi rispetto a quanto osservato in altro materiale vegetale, mentre per gli inquinanti atmosferici organici, in muschi quali *Leptodon smithii* sono state riscontrate minori concentrazioni di IPA a basso peso molecolare rispetto a foglie di leccio (de Nicola et al. 2013). In uno studio condotto da Kansanen e Venetvaara (1991), è stata osservata una correlazione significativa tra la deposizione di diversi metalli e il loro contenuto in campioni di *Pleurozium schreberi* e *Hylocomium splendens*, con valori ben riproducibili e più elevati in confronto al lichene *Hypogymnia physodes*. La minor efficienza di accumulo

dei licheni è stata contestata da [Lippo et al. \(1995\)](#). Tuttavia, le differenze tra i risultati di diversi studi possono essere dovute a diversi fattori, come le procedure di pulizia dei campioni prima della determinazione analitica e le parti di muschio utilizzate per l'analisi [le porzioni terminali più giovani in [Lippo et al. \(1995\)](#), un mix di segmenti giovani e vecchi in [Kansanen e Venetvaara \(1991\)](#)].

Anche nel caso dei muschi sono state riportate differenze interspecifiche di accumulo di metalli traccia. Ad esempio [Mendil et al. \(2009\)](#) hanno osservato concentrazioni maggiori di Fe, Cu e Cd, ma minori di Mn e Zn, in *Tortula muralis* rispetto a *Tortula intermedia*. Nello stesso studio si è ipotizzato un accumulo selettivo di Pb, Ni e Cr in *Barbula unguiculata*. [Berg e Steinnes \(1997\)](#) hanno osservato concentrazioni più alte in *Hylocomium splendens*, rispetto a *Pleurozium schreberi*, per 20 elementi su un totale di 24 analizzati (Co, Cr, Cu, Dy, Eu, Er, Fe, Ga, Gd, Lu, Mo, Ni, Nb, Pb, Sb, Tb, Th, Tl, Tm e W). [Uyar et al. \(2007\)](#) hanno valutato diverse specie trovando accumuli maggiori per diversi elementi in *Hypnum lacunosum*, *Bryum glaerosum*, *Hypnum cupressiforme* e *Scleropodium purum*. Differenze interspecifiche tra *H. cupressiforme* e *P. schreberi* sono state osservate anche in studi basati sul contenuto di isotopi dell'N. Queste differenze, oltre ad evidenziare l'importanza della selezione della specie da utilizzare a fini applicativi, implicano anche la difficoltà di programmare studi di intercalibrazione tra specie diverse. Già a partire dagli anni '50 del secolo scorso ([Wegener et al. 1992](#)), i muschi sono stati oggetto di studio per molti inquinanti inorganici ed organici. In alcuni casi entrambi i tipi di analiti sono stati oggetto dello stesso studio, come ad esempio in [Gerdol et al. \(2002\)](#), che hanno determinato PAH e metalli in siti urbani e rurali del Nord Italia.

Non è sempre possibile trovare campioni delle specie idonee nelle aree di interesse per gli studi sull'inquinamento atmosferico, che spesso sono aree industriali o comunque ad elevato impatto antropico ([Buonocore et al. 2013](#)). E' quindi possibile utilizzare specie trapiantate da aree prossimo-naturali nei siti di interesse. Questo consente di superare le limitazioni imposte dalla distribuzione naturale delle popolazioni muscicole, permettendo inoltre tempi di esposizione ben definiti ([Wegener 1992](#)). I muschi sono stati utilizzati non solo per lo studio delle deposizioni degli inquinanti, ma anche per determinare il loro trasporto in atmosfera su lunghe distanze, come ad esempio nello studio di [Liu et al. \(2005\)](#), che ha fornito informazioni sul ruolo delle alte montagne nel sud della Cina nel trasporto atmosferico di PAH. *Polytrichum formosum* è stato utilizzato come biomonitor per studiare la ripartizione dei contributi di diverse sorgenti di emissione di Pb, utilizzando rapporti isotopici ([Kunert et al. 1999](#)). In alcuni Paesi, come l'Ungheria, i muschi sono impiegati in indagini nazionali, con 116 siti di monitoraggio dei metalli pesanti ([Ötvös et al 2003](#)). In altri casi sono stati condotti monitoraggi a lungo termine, come in [Poikolainen et al. \(2004\)](#), che hanno indagato la variazione temporale del contenuto di metalli pesanti in muschi in un sito modello per il periodo 1985-2000. Ma la più impressionante serie di indagini sono quelle inaugurate ancora nel 1975 con il primo survey nazionale della Svezia, presto esteso a tutti i Paesi scandinavi (1985), quindi a quelli baltici (1990), quindi ancora ai Paesi del Nord e Centro Europa (1995). Attualmente queste indagini rientrano tra le attività pianificate dal ICP Vegetation e continuano a svolgersi con cadenza quinquennale

(Harmens et al. 2010). L'Italia vi ha partecipato solo sporadicamente e senza mai essere in grado di coprire l'intero suo territorio nazionale.

Recentemente, sono stati condotti diversi studi finalizzati alla verifica delle capacità di accumulo in muschi sottoposti a diversi trattamenti, a scopo di standardizzazione metodologica. Ad esempio sono stati confrontati campioni trapiantati irrigati e non irrigati (Aničić et al. 2009b) e campioni trapiantati vivi o devitalizzati (Adamo et al. 2007; Giordano et al. 2009; Tretiach et al. 2011). In quest'ultimo caso, i risultati dimostrano che i muschi devitalizzati forniscono risultati migliori, per due ragioni principali: minor variabilità dei valori pre e post esposizione (Adamo et al. 2007; Castello 1996; Gailey e Lloyd 1986; Giordano et al. 2009); assenza di effetti sui risultati dovuti a processi metabolici intrinseci al biomonitor (Giordano et al., 2009). In proposito, Fernández et al. (2010) hanno dimostrato che la crescita di *Pseudoscleropodium purum* durante il periodo di esposizione influenza l'assorbimento di metalli e genera differenze di concentrazione elemento-specifiche, fornendo ulteriore supporto all'utilizzo di campioni devitalizzati per garantire maggior riproducibilità dei risultati. L'utilizzo di campioni trapiantati devitalizzati è ampiamente riportato nella letteratura recente (Ares et al. 2014; Giordano et al. 2013; Tretiach et al. 2011) e la tecnica è stata ottimizzata per questo tipo di trapianti (Ares et al. 2012). Tale tecnica è attualmente utilizzata in un importante progetto di ricerca europeo sul biomonitoraggio mediante muschi terrestri ed acquatici, il progetto MossClone ([www.mossclone.eu](http://www.mossclone.eu)).

### 3. NORMATIVA VIGENTE IN AMBITO NAZIONALE E INTERNAZIONALE

#### 3.1 BIOMONITORAGGIO E QUALITÀ DELL'ARIA

L'impatto dell'inquinamento atmosferico sta progressivamente aumentando a livello globale. La sua valutazione a scala nazionale, regionale e locale, è il primo passo necessario per la raccolta di dati di base fondamentali, che possano essere utilizzati per evitare, prevenire e minimizzare gli effetti nocivi degli inquinanti aerotrasportati sia sulla salute umana, sia sull'ambiente nel suo complesso. A tale scopo, il biomonitoraggio può essere utilizzato come strumento conoscitivo ed applicativo. Infatti, gli effetti dell'inquinamento atmosferico su organismi indicatori, in una data area, sono il risultato, integrato nel tempo, di interazioni complesse che coinvolgono sia la qualità dell'aria, sia altre condizioni ambientali locali (e.g. il clima, l'uso del suolo), sia lo stato fisiologico-metabolico dell'organismo, nonché fattori di disturbo e fattori biologici. Per queste ragioni, il biomonitoraggio costituisce un approccio biologico olistico in grado di fornire risultati particolarmente prossimi agli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute dell'ambiente e dell'uomo ed è quindi di primaria rilevanza per la gestione della qualità dell'aria.

E' importante rilevare che i dati di biomonitoraggio sono completamente diversi da quelli ottenuti mediante misure chimico-fisiche, come le concentrazioni e deposizioni ambientali degli inquinanti, o mediante simulazioni modellistiche, come i dati sulle emissioni in atmosfera derivanti da attività naturali e/o antropiche. Infatti il biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico evidenzia gli effetti che gli inquinanti aerotrasportati hanno sugli organismi. Come tale, esso fornisce indicazioni biologicamente rilevanti, basate su osservazioni di campo e integrate nel tempo e nello spazio, sulla salute dell'ambiente nel suo complesso.

Il biomonitoraggio è la maniera originale con cui, storicamente, sono stati rilevati cambiamenti ambientali a seguito di fenomeni di inquinamento atmosferico. Infatti, i primi studi sul biomonitoraggio passivo sono documentati nella metà del XIX secolo a Parigi: dal monitoraggio dello sviluppo dei licheni epifiti si scoprì che i talli venivano danneggiati durante periodi di maggior inquinamento, in inverno, mostrando successivamente un notevole recupero morfologico e una maggior crescita in estate (Nylander, 1866). Queste prime osservazioni esplorative identificarono i licheni come importanti biomonitori, a cui solo a notevole distanza di tempo seguiranno esaustivi studi sulle piante vascolari (Cohen e Ruston, 1912). Indagini di poco precedenti avevano affrontato il tema del bioaccumulo: una procedura con piante di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) fu proposta ed applicata nel 1899 (Sorauer e Ramann, 1899).

In periodi successivi, la ricerca scientifica ha prodotto un notevole incremento delle conoscenze sul tema del biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico, che hanno dato origine allo sviluppo di diverse tecniche applicative. Vari testi scientifici sul biomonitoraggio, pubblicati negli ultimi trent'anni, sono considerati lavori di riferimento dalla comunità scientifica internazionale (e.g. Arndt et al., 1987; Bargagli, 1998; Garrec e Van Haluwyn, 2002; Nimis et al., 2002; Klumpp et al., 2004). Tali testi, oltre a fornire un quadro d'insieme sullo stato dell'arte recente, costituiscono un notevole patrimonio di procedure metodologiche, il cui rigoroso approfondimento

critico ha originato l'implementazione, tutt'ora in corso, di linee guida e norme standard a livello sia nazionale sia internazionale.

Attualmente, la legislazione vigente, sia a livello internazionale (Decisione Quadro 2003/80/GAI del Consiglio dell'Unione Europea, v. anche proposta di Direttiva della Commissione UE al Parlamento europeo del 27/01/2003), sia nazionale (legge n. 68 dd. 22/07/2015, cosiddetta "ecoreati e disastri ambientali", che modifica il T.U.A. e in particolare l'art. 452 del Codice di Procedura Penale), stabilisce che gli effetti ambientali nocivi dovuti all'inquinamento atmosferico sono penalmente perseguiti come reato e che, come tali, non dovrebbero verificarsi. Questa prescrizione può essere soddisfatta solo tramite accertamento degli effetti dell'inquinamento a livello biologico. L'applicazione delle tecniche di biomonitoraggio nella gestione della qualità dell'aria e dell'ambiente richiede pertanto standard metodologici rigorosi e riconosciuti, in modo da poter essere valutata, a livello gestionale, secondo le medesime modalità rispetto alle misure chimico-fisiche e alle simulazioni modellistiche.

Di seguito viene presentato un inquadramento del biomonitoraggio ambientale dell'inquinamento atmosferico nell'ambito della legislazione vigente, sia in Unione Europea sia in Italia. Nell'ultima sezione del capitolo si riassumono linee guida e norme tecniche attualmente in vigore per le più diffuse tecniche di biomonitoraggio, con riferimento ai documenti originali ed alle modalità di loro distribuzione ed acquisizione.

### **3.2 IL BIOMONITORAGGIO NELLA LEGISLAZIONE EUROPEA E NAZIONALE**

I metodi di biomonitoraggio degli ambienti terrestri rispondono a diversi requisiti ed obiettivi della policy ambientale UE, principalmente nei campi della qualità dell'aria (Direttiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, dd. 21/05/2008 relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa), della prevenzione e riduzione integrate dell'inquinamento (Direttiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio dd. 15/01/2008) e delle emissioni industriali (Direttiva 2010/75/CE del Parlamento europeo e del Consiglio dd. 24/11/2010) e della conservazione degli habitat (Direttiva n. 92/43/CE dd. 21/05/1992, relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche).

Sono inoltre interessati anche i temi della catena alimentare (Regolamento n. 1831/2003 della Commissione Europea dd. 19/12/2003 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari) e della nutrizione animale (Direttiva n. 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, dd. 07/05/2002, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali e successive integrazioni, con particolare riferimento alle Direttive n. 2005/87/CE dd. 05/12/2005 e n. 2016/13/CE dd. 03/02/2006, e ai Regolamenti della Commissione Europea n. 574/2011 dd. 16/06/2011, n. 277/2012 dd. 28/03/2012, n. 744/2012 dd. 16/08/2012, riguardo ai limiti del contenuto di esaclorobenzene, diossine, PCB diossino-simili, fluoro, mercurio, arsenico, cadmio, piombo).

Riguardo alla qualità dell'aria in Europa, la legge richiede un adeguato monitoraggio degli inquinanti, incluse le loro deposizioni, così come l'elusione, la prevenzione e la riduzione dei loro effetti nocivi sulla salute umana e dell'ambiente. I metodi di biomonitoraggio sono quindi pertinenti agli obiettivi di accertamento

della qualità dell'aria, sia a breve sia a lungo termine. In particolare, la Direttiva n. 2004/107/CE dd. 15/12/2004, in relazione alla presenza e contenuto di arsenico, cadmio, mercurio, nichel e idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente, considera nelle premesse che *"Gli effetti dell'arsenico, del cadmio, del mercurio, del nichel e degli idrocarburi policiclici aromatici sulla salute umana, compreso attraverso la catena alimentare, e sull'ambiente nel suo complesso, sono dovuti alle concentrazioni nell'aria ambiente e alla deposizione"* e che *"la Commissione e gli Stati membri dovrebbero promuovere la ricerca sugli effetti di arsenico, cadmio, mercurio, nichel e idrocarburi policiclici aromatici sulla salute umana e l'ambiente, segnatamente attraverso la deposizione."* La stessa Direttiva, al comma 10 dell'art. 4 *"Valutazione delle concentrazioni nell'aria ambiente e dei tassi di deposizione"* stabilisce che *"È possibile considerare l'impiego di bioindicatori laddove debbano essere valutati i tipi di impatto sugli ecosistemi in una regione."*

Riguardo la normativa sulla Prevenzione e Riduzione Integrata dell'Inquinamento da installazioni industriali (IPPC, Integrated Pollution Prevention and Control, Direttive 2008/1/CE e 2010/75/CE), la procedura autorizzativa (AIA, Autorizzazione Integrata Ambientale) include due condizioni ambientali specifiche per la definizione dei valori limite per le emissioni. I concetti di "effetto" e "sensibilità dell'ambiente locale", asseriti nelle norme, pongono ampie basi per l'applicazione di diverse tecniche di biomonitoraggio, in relazione a impatti sia di carattere generale, sulla qualità dell'aria, sia a carico di inquinanti particolari, traccianti di specifici processi industriali. Tra questi vanno certamente segnalati i valori limite per le emissioni di specifici inquinanti da particolari tipologie di impianti, elencati agli allegati V (per gli impianti di combustione) e VI (per gli impianti di incenerimento rifiuti) della Direttiva 2010/75/CE e ripresi nella legislazione nazionale dal Testo Unico Ambientale, Decreto Legislativo n. 152 dd. 3/4/2006 (Allegato II) e successive integrazioni (Decreto Legislativo n. 46 dd. 04/03/2014).

Per gli impianti di combustione, distinguendo i valori limite ammessi per i diversi inquinanti a seconda di fattori tecnici relativi agli impianti, quali ad esempio il tipo di combustibile, la potenza termica e il periodo di esercizio, sono stabiliti valori limite per: biossido di zolfo (SO<sub>2</sub>), ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>) ed alcuni metalli e loro composti, inclusi Be, somma di Cd, Hg, Tl, somma di As, Cr (VI), Co e Ni, somma di Se, Te e Ni, somma di Sb, Cr (III), Mn, Pd, Pb, Pt, Cu, Rh, Sn, V.

Per gli impianti di incenerimento rifiuti, anche in questo caso con valori limite diversi a seconda di caratteristiche tecniche e di esercizio degli impianti, si stabiliscono limiti alle emissioni di: inquinanti organici persistenti (POP) quali diossine e furani, policlorobifenili (PCB) e PCB diossino-simili (PCB-DL) e carbonio organico totale (TOC); inquinanti gassosi quali fluoruro di idrogeno (HF), biossido di zolfo (SO<sub>2</sub>), monossido (NO) e biossido (NO<sub>2</sub>) di azoto, ammoniaca (NH<sub>3</sub>); elementi inorganici e loro composti, quali cadmio (Cd), tallio (Tl), mercurio (Hg), antimonio (Sb), arsenico (As), piombo (Pb), cromo (Cr), cobalto (Co), rame (Cu), manganese (Mn), nichel (Ni) e vanadio (V).

E' estremamente rilevante che tutti gli inquinanti elencati dalle norme tecniche in materia ambientale siano stati oggetto di studi di bioaccumulo mediante licheni e/o muschi. Ovviamente le conoscenze scientifiche e lo stato di standardizzazione dei protocolli operativi delle diverse tecniche è estremamente diversificata in relazione ai diversi inquinanti; per esempio nel caso dei gas fitotossici e dei metalli l'esperienza

trentennale e la standardizzazione metodologica garantiscono protocolli operativi maturi per un'applicazione affidabile in ambito gestionale e istituzionale. In altri casi, come per gli inquinanti organici persistenti, di recente inclusione nell'elenco delle emissioni normate, l'applicazione di tecniche di biomonitoraggio è basata su esperienze di ricerca scientifica relativamente recenti e che necessitano di opportuni approfondimenti metodologici prima della loro traduzione in protocolli operativi standardizzati e del loro trasferimento alle istituzioni competenti come strumento di prevenzione e valutazione ambientale.

Le caratteristiche intrinseche delle diverse tecniche di biomonitoraggio possono essere utilizzate in modo opportuno e vantaggioso, rispetto all'accertamento strumentale e modellistico, per applicazioni di diverso tipo, come ad esempio la compilazione di inventari di riferimento prima dell'inizio di una nuova installazione, la mappatura di aree di potenziale ricaduta delle deposizioni inquinanti, la validazione della modellistica di dispersione degli inquinanti per la stima delle aree a ricaduta potenziale delle deposizioni, il monitoraggio a medio e lungo termine dell'impatto causato dall'attività industriale, o l'accertamento generale dell'effetto delle deposizioni inquinanti in una data area, riferita a uno specifico ambito temporale di esposizione di organismi biomonitors. Inoltre, l'ispezione ambientale degli impianti industriali (Art. 23 Direttiva 2010/75/CE) richiede l'esame integrale dell'intera gamma di effetti sull'ambiente prodotti dagli impianti interessati. Per l'autorità pubblica, i dati derivanti dal biomonitoraggio ambientale possono contribuire al processo decisionale, ad esempio riguardo la questione della tolleranza dell'ambiente agli impatti su scala locale.

La Direttiva Habitat (Direttiva n. 92/43/CE) impone alle autorità competenti la verifica e revisione della pianificazione autorizzativa e delle attività di potenziale interesse per un sito di conservazione designato a livello Europeo, qualora l'integrità del sito possa essere compromessa. La direttiva prevede anche il controllo delle operazioni potenzialmente dannose per l'ambiente, gli habitat naturali e seminaturali, la flora spontanea e la fauna selvatica. Il consenso per tali opere può essere concesso solo qualora una valutazione del caso abbia stabilito che l'operazione proposta non pregiudicherà l'integrità del sito. La responsabilità di dimostrare che non sussiste alcun effetto negativo su una data area di conservazione spetta al richiedente. A tal fine, il biomonitoraggio si adatta bene come tecnica non invasiva di valutazione ambientale.

Come elemento importante nell'ambito della politica ambientale integrata, la Commissione Europea nel 2003 ha adottato una Strategia Europea per l'Ambiente e la Salute (COM/2003/0338 Comunicazione della Commissione al Consiglio, al Parlamento Europeo e al Comitato Economico e Sociale Europeo), con l'obiettivo generale di ridurre le malattie causate da fattori ambientali in Europa. Il Piano d'Azione Europeo per l'Ambiente e la Salute 2004-2010 (COM/2004/416 Comunicazione della Commissione al Consiglio, al Parlamento Europeo e al Comitato Economico e Sociale Europeo), che ha seguito l'adozione della Strategia, si concentra sul biomonitoraggio umano, ma sottolinea la necessità di *"sviluppare un monitoraggio integrato dell'ambiente, compresi gli alimenti, per consentire la determinazione dell'esposizione rilevante per l'uomo"*. A questo proposito, la norma tecnica europea sul biomonitoraggio dell'aria ambiente mediante diversità dei licheni epifiti (CEN, 2014) afferma che *"l'approccio [al biomonitoraggio] mediante comunità*



*biologiche implica la raccolta di dati sugli inquinanti in tutti i diversi comparti ambientali (compreso il ciclo degli inquinanti) e nell'intero ecosistema (bioindicatori) ed il loro collegamento a dati sanitari (epidemiologici, tossicologici, di morbilità)", evidenziando un ruolo potenziale del biomonitoraggio ambientale, o almeno di alcune tecniche, come strumento conoscitivo rilevante non solo a fini ambientali, ma anche sanitari.*

### **3.3 IL BIOMONITORAGGIO NELLA VALUTAZIONE DI IMPATTO AMBIENTALE**

La valutazione di impatto ambientale (VIA) è una procedura amministrativa di supporto per l'autorità competente (e.g. Ministero dell'Ambiente o Regione) finalizzata ad individuare, descrivere e valutare gli impatti ambientali di un'opera, il cui progetto è sottoposto ad approvazione o autorizzazione.

Nella procedura di VIA la valutazione sulla compatibilità ambientale di un determinato progetto è svolta dalla Pubblica Amministrazione, che si basa sia sulle informazioni fornite dal proponente del progetto, sia sulla consulenza data da altre strutture della Pubblica Amministrazione, sia sulla partecipazione di privati cittadini e gruppi sociali.

In questo contesto con "impatto ambientale" si intende un effetto rilevante causato da un evento, un'azione o un comportamento sullo stato di qualità delle componenti ambientali, inteso sia come ambiente antropizzato, sia come ambiente naturale, incluse flora e fauna. Secondo la normativa comunitaria i progetti che possono avere un effetto rilevante sull'ambiente, inteso come ambiente naturale e ambiente antropizzato, devono essere sottoposti a procedura VIA. Questa mostra quali modifiche di stato dell'ambientale possano derivare dalle azioni e dalle pressioni antropiche. Nella VIA si cerca quindi di stimare quali siano gli impatti, cioè le modifiche, positive o negative, degli stati ambientali di fatto, indotti dall'attuazione di un determinato progetto.

La normativa italiana sulla VIA è particolarmente complessa ed articolata anche a scala regionale. Il quadro normativo comprende, allo stato attuale, oltre 110 dispositivi a livello nazionale e regionale. Per una trattazione approfondita sull'evoluzione normativa e procedurale, si veda [Romagnoli \(2007\)](#) e aggiornamenti successivi. La complessità della normativa è legata alla predisposizione di frequenti modifiche al Codice dell'ambiente, che prevedono spesso revisioni di parti significative dell'articolato sulla VIA.

La valutazione d'impatto ambientale comprende, secondo le disposizioni normative italiane:

- a) lo svolgimento di una verifica di assoggettabilità (screening);
- b) la definizione dei contenuti dello studio di impatto ambientale (scoping);
- c) la presentazione e la pubblicazione del progetto;
- d) lo svolgimento di consultazioni;
- e) la valutazione dello studio ambientale e degli esiti delle consultazioni;
- f) la decisione;
- g) l'informazione sulla decisione;
- h) il monitoraggio ambientale.

In relazione all'ultimo punto, il monitoraggio ambientale ha come obiettivo principale la valutazione dell'accuratezza delle stime preliminari e l'assicurazione che non si verifichino impatti impreveduti. In sostanza il monitoraggio serve per tenere sotto controllo la situazione durante le varie fasi di vita degli interventi sottoposti a VIA dopo la loro approvazione.

Il biomonitoraggio si inserisce tra le azioni utili per queste finalità, come dimostrato dalla sua implementazione, su prescrizioni delle istituzioni competenti (commissioni VIA del M.A.T.T.M. e Regionali) in diversi casi di opere di interesse ambientale autorizzate in Italia negli ultimi 20 anni. In particolare, è stata prescritta l'implementazione di campagne di biomonitoraggio per la valutazione degli effetti ambientali delle emissioni di impianti termoelettrici di produzione energia. La compilazione di un elenco dettagliato non è realizzabile a partire dagli archivi delle competenti commissioni VIA regionali, che non consentono una ricerca mirata, ad esempio, per parole chiave. Né è possibile risalire ai procedimenti istituzionali nei casi in cui i risultati delle indagini di biomonitoraggio siano stati oggetto di pubblicazione su rivista scientifica, che non riportano i riferimenti alle procedure VIA. Tuttavia, è stato possibile effettuare una ricerca per parole chiave (i.e "biomonitoraggio", "licheni", "muschi") nell'archivio dei progetti di VIA in corso di valutazione presso la Commissione nazionale. In Tabella 4 si riportano esempi illustrativi dei risultati di tale ricerca, con specificato il progetto in corso di valutazione e la tecnica di biomonitoraggio proposta.

**Tabella 4.** Esempi di progetti di V.I.A. che includono attività di biomonitoraggio (da <http://www.va.minambiente.it/it-IT/Ricerca/ViaLibera?Testo=licheni&T=d>)

Progetto	Titolo	Data
Concessione Fiume Treste Stoccaggio: ampliamento capacità di stoccaggio, da realizzarsi mediante a) incremento della pressione massima di esercizio (pmax) oltre la pressione statica di fondo originaria (pi) del livello C2 (pmax = 1,10pi) del giacimento, b) sviluppo allo stoccaggio del nuovo livello F del giacimento, con perforazione di 4 nuovi pozzi e realizzazione nell'impianto di trattamento della esistente centrale di stoccaggio degli interventi infrastrutturali necessari	Biomonitoraggio - Analisi dei licheni	01/02/2013
Autostrada Salerno-Reggio Calabria: lavori di ammodernamento ed adeguamento al tipo 1/a delle norme CNR/80 dal Km 393+500 (Svincolo di Gioia Tauro escluso) al Km 423+300 (Svincolo di Scilla escluso) - 5° Macrolotto	PMA: Atmosfera - Analisi Licheni	07/02/2006
S.S. 106 Jonica: lavori di costruzione della Variante di Nova Siri con adeguamento della sezione stradale alla categoria B1. Tronco 9° dal km414+080 al km419+300 ex 1°- 2°- 3°- 4° Lotto	Monitoraggio della qualità dell'aria tramite licheni IBL	03/10/2011
S.S. 106 Jonica: lavori di costruzione della Variante di Nova Siri con adeguamento della sezione stradale alla categoria B1. Tronco 9° dal km414+080 al km419+300 ex 1°- 2°- 3°- 4° Lotto	Monitoraggio ambientale per la qualità dell'aria tramite licheni IBL	23/10/2012
S.S. 106 Jonica: lavori di costruzione della Variante di Nova Siri con adeguamento della sezione stradale alla categoria B1. Tronco 9° dal km414+080 al km419+300 ex 1°- 2°- 3°- 4° Lotto	Monitoraggio ambientale per la qualità dell'aria tramite licheni IBL	08/04/2013
S.S. 106 Jonica: lavori di costruzione della Variante di Nova Siri con adeguamento della sezione stradale alla categoria B1. Tronco 9° dal km414+080 al km419+300 ex 1°- 2°- 3°- 4° Lotto	Monitoraggio ambientale per la qualità dell'aria tramite licheni IBL	14/10/2013
S.S. 106 Jonica: lavori di costruzione della Variante di Nova Siri con adeguamento della sezione stradale alla categoria B1. Tronco 9° dal km414+080 al km419+300 ex 1°- 2°- 3°- 4° Lotto	Monitoraggio ambientale per la qualità dell'aria tramite licheni IBL	24/07/2014

### 3.4 PROCESSI DI NORMAZIONE E LINEE GUIDA METODOLOGICHE

Questa sezione include una sintesi dei protocolli operativi per le tecniche basate su licheni e muschi più utilizzate a livello nazionale. Alcuni costituiscono standard europei, pubblicati come norme tecniche dal Comitato Europeo di Normazione (CEN) e recepiti dagli enti di normazione nazionali (in Italia UNI, Ente Nazionale Italiano di Unificazione), in altri casi si tratta di linee guida operative, pubblicate da ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) con finalità di standardizzazione metodologica a compendio dell'esperienza pregressa di ricerca scientifica. Indipendentemente dal diverso stato di avanzamento normativo e recepimento istituzionale delle diverse tecniche di biomonitoraggio, l'insieme delle procedure metodologiche di seguito riportate costituisce una sintesi fondata su solide basi scientifiche, finalizzato all'implementazione di procedure oggettive e riproducibili e all'acquisizione di dati di campo e di laboratorio il più possibile accurati e precisi. Come tale, costituisce un presupposto necessario all'equiparazione del biomonitoraggio ambientale alle misure chimico-fisiche ed alle simulazioni modellistiche, come strumento operativo e gestionale per la valutazione dell'inquinamento atmosferico, al suo recepimento in ambito legislativo e alla sua applicazione routinaria in ambito nazionale ed internazionale da parte delle istituzioni competenti.

Tali protocolli dovrebbero essere periodicamente rivisti ed aggiornati seguendo gli sviluppi della ricerca di base e l'accumularsi di nuovi dati relativi al territorio nazionale. Studi di base sulla variabilità dei dati possono migliorare le strategie di campionamento, e nuovi dati possono portare alla modifica di valori di riferimento o scale di interpretazione. Infine, le linee-guida riportate per l'applicazione a livello nazionale dovranno quanto prima integrarsi a livello europeo, confrontandosi criticamente con analoghe esperienze svolte in altri Paesi. Tutte queste attività sono portate avanti da diversi gruppi di ricerca in Italia per i quali l'Università di Trieste è da trent'anni punto di riferimento. Nonostante le difficoltà congiunturali del contesto socio-economico in cui la ricerca di base versa attualmente nel nostro Paese, queste attività sono indispensabili per assicurare uno sviluppo serio, integrato e duraturo delle tecniche di biomonitoraggio in Italia.

#### 3.4.1 Biodiversità Lichenica

La tecnica di bioindicazione tramite licheni epifiti determina lo stato effettivo della diversità lichenica precedente o successivo ad eventi o periodi prolungati di esposizione all'inquinamento atmosferico, e/o ad altri tipi di stress ambientale. Studi correlativi tra diversità lichenica e dati epidemiologici suggeriscono che questi bioindicatori possano costituire uno strumento conoscitivo per rilevare possibili effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute umana, a scala epidemiologica (Cislaghi e Nimis, 1997).

Allo stato attuale, la tecnica di bioindicazione dell'inquinamento da gas fitotossici tramite licheni epifiti è normata a livello europeo dallo standard EN 16413 "Ambient air - Biomonitoring with lichens - Assessing epiphytic lichen diversity", che codifica le procedure di campionamento e di calcolo di indici sintetici correlati all'alterazione ambientale. Questo standard Europeo, alla cui progettazione, stesura ed approvazione il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste ha

attivamente partecipato mediante adeguata rappresentanza nell'ambito del gruppo di esperti facenti parte del WG31 della TC264 del CEN (Comité Européen de Normalisation), propone un metodo standardizzato per l'accertamento della diversità lichenica epifita. Tale metodo è largamente basato sullo standard VDI tedesco sulla mappatura dei licheni (Wirth 1995; VDI 2005), sullo standard nazionale francese (AFNOR 2008), sulle linee guida italiane (Nimis 1999; ANPA 2001) e sul metodo suggerito da Asta et al. (2002). L'interpretazione dei pattern geografici e dei trend temporali della biodiversità lichenica può essere assistita dall'utilizzo di indici ecologici (Hawksworth e Rose 1970; Nimis e Martellos 2001; Wirth 2010), statistiche multivariate, incluse le analisi numeriche di classificazione e ordinamento (Podani 2000; Giordani et al. 2002; Giordani 2006), modelli non parametrici (McCune e Mefford 2004; Giordani 2007) o altri strumenti di analisi statistica.

Il documento tecnico originale (CEN 2014a), dopo brevi sezioni introduttive sullo stato dell'arte, su termini, definizioni e principi utilizzati nel documento, elenca dettagliatamente l'attrezzatura necessaria per le attività di campo e di laboratorio. Segue una sezione consistente sul campionamento, che prescrive rigorosamente le procedure da applicare in fase di pianificazione e nel corso dell'effettuazione delle operazioni in campo. In particolare, viene posta particolare attenzione su una serie di criteri atti a minimizzare possibili errori sistematici (*bias*) dovuti alla soggettività degli operatori. Si definiscono pertanto parametri e valori da considerare per la definizione degli alberi idonei al campionamento dei licheni epifiti (specie arboree e individui *standard*) che costituiscono la popolazione di riferimento. La selezione del campione su cui effettuare i rilievi di diversità lichenica avviene secondo schemi probabilistici (e.g. campionamento randomizzato, stratificato, clusterizzato) la cui definizione, strettamente determinata in base al contesto ambientale di riferimento, viene guidata secondo una casistica ben codificata che sintetizza le condizioni più frequentemente riscontrabili nella pratica. Seguono la descrizione delle procedure da applicare, in ciascuna unità campionaria, per effettuare il rilievo lichenologico, e quella dei protocolli di laboratorio per l'identificazione di taxa critici, non determinabili macroscopicamente in campo. Il rilievo consiste nel censimento di tutte le specie licheniche che ricadono entro le subunità di una griglia, di forma e dimensioni prefissate, apposta sul fusto degli alberi standard selezionati nel campione secondo modalità codificate dettagliatamente. Un'ulteriore sezione della norma illustra una serie di indici di diversità calcolabili a partire dai risultati dei rilievi, che sono di utilità specifica in relazione a possibili obiettivi del monitoraggio (e.g. inquinanti acidificanti, eutrofizzanti, ecc.). In appendice, le procedure di controllo e garanzia di qualità da applicare sia per la valutazione di singoli operatori, sia per l'intecalibrazione di più operatori o squadre.

Per il dettaglio dei protocolli operativi si rimanda al documento tecnico originale (CEN 2014a), che è disponibile in vendita presso gli enti di normazione nazionali di tutti i Paesi europei, ma non liberamente distribuibile, né *in toto* né in parte.

### **3.4.2 BIOACCUMULO TRAMITE LICHENI *IN SITU***

La metodica qui illustrata deriva da una sintesi di quelle adottate nei numerosi studi svolti in Italia e all'estero (p.es. Bargagli 1988; 1995; 1998; Nimis et al. 1993; Bargagli e Nimis 2003), sia su aree ristrette che a scala regionale. Le procedure operative qui

descritte sono state recepite istituzionalmente a livello nazionale con la redazione di un "Manuale operativo per il bioaccumulo di elementi in traccia tramite licheni", che ha coinvolto i principali gruppi di ricerca attivi in Italia in questo campo. Mai pubblicato *de facto* a stampa, esso era incluso tra le pubblicazioni APAT fino pochi anni fa ed era liberamente scaricabile dal portale web istituzionale ISPRA in una delle sue versioni ancora non definitive. A una recente verifica non è risultato elencato tra le risorse disponibili e quindi se ne riporta una sintesi qui di seguito.

Si utilizzano licheni epifiti, in quanto le scorze d'albero, contrariamente ai substrati litici, assicurano substrati relativamente omogenei per composizione chimica. I limiti principali della metodica sono i seguenti: a) non è applicabile in aree con generale scarsità di alberi, b) non è applicabile in aree molto inquinate da gas fitotossici con scarsità di licheni foliosi, c) non permette di stabilire una relazione univoca tra concentrazioni di metalli nei licheni e deposizioni di metalli/m<sup>2</sup> (principalmente a causa della ridotta disponibilità di misure strumentali). I principali vantaggi sono: a) possibilità di ottenere rapidamente, a bassi costi, e con un'alta densità di punti-misura, una mappatura delle deposizioni atmosferiche di metalli, a diverse scale territoriali, b) possibilità di individuare i pattern geografici del loro trasporto e deposizione, e di valutare l'affidabilità di modelli diffusionali, c) possibilità di verificare, su lunghi periodi di tempo, l'efficacia di misure eventualmente introdotte per ridurre le emissioni di metalli, d) valutazione di tendenze temporali ad intervalli di almeno un anno, e) rapida individuazione delle principali aree a rischio per l'eventuale localizzazione di strumenti di rilevazione e/o lo sviluppo di ricerche epidemiologiche. I risultati permettono di valutare le deviazioni da condizioni normali delle concentrazioni di metalli in traccia in organismi notoriamente capaci di accumulo dall'atmosfera.

### **Strategie di Campionamento**

Obiettivi, scale territoriali e strategie di campionamento sono interrelati. La scala territoriale può essere di tipo locale-puntiforme, o interessare aree vaste. L'inquinamento da metalli può avvenire sotto forma di particellato più o meno pesante, e quindi con ricadute su aree più o meno ristrette rispetto alla fonte, per cui un campionamento su un'area vasta con scarsa densità di punti-misura può rivelarsi inadeguato. Nella delimitazione dell'area di studio e nella scelta della densità di campionamento vanno considerati, ove possibile, i tassi di dispersione di specifici metalli a partire da presumibili fonti.

Per consentire un adeguato trattamento statistico dei dati e facilitare il confronto tra studi diversi, è consigliabile un campionamento sistematico, basato su una suddivisione del territorio in Unità Geografiche Operazionali (OGUs), preferibilmente di forma regolare (quadranti). Sono preferibili griglie di campionamento già utilizzate a scala nazionale e/o internazionale. In alcuni casi è preferibile un campionamento lungo transetti a distanze crescenti rispetto alla fonte. Nei seguenti casi può essere adeguato anche un campionamento preferenziale: a) quando l'obiettivo si limita alla descrizione della situazione in un singolo punto, b) quando l'obiettivo è la comparazione di una serie di siti a rischio già precedentemente individuati sulla base di altre informazioni, c) quando l'obiettivo è il ri-campionamento di un'area originariamente campionata in modo preferenziale, per evidenziare variazioni

temporali. In casi specifici può essere consigliata l'adozione di un campionamento sistematico in una prima fase, l'elaborazione dei dati relativi a questo campionamento, un ulteriore campionamento su scala più ridotta, nelle aree con la maggiore variazione geografica nelle concentrazioni di determinati metalli.

### **Campionamento**

Il campionamento si può effettuare soltanto su licheni epifiti foliosi a lobi relativamente larghi, e cioè sia su specie di macrolicheni parmelioidi (di seguito raggruppati sotto il generico nome di *Parmelie*) che su *Xanthoria parietina*. Va utilizzata una sola specie di lichene nell'ambito di un singolo studio, la cui distribuzione copra l'intera area interessata dall'indagine.

Il campionamento va effettuato su superfici che soddisfano le seguenti condizioni:

- a) alberi con tronco la cui inclinazione non superi i 10°,
- b) alberi con assenza di segni evidenti di disturbo (verniciature, chiodi o puntine piantati sul tronco, ecc.),
- c) superfici non fortemente concave, e non interessate a periodico scolo d'acqua piovana,
- d) superfici non decorticate,
- e) superfici libere da briofite.

Se la stazione fa parte di un'indagine di bioindicazione tramite licheni, occorre evitare di campionare su alberi utilizzati in tale indagine.

E' consigliabile localizzare alcune stazioni in aree con il minore impatto antropico e con presumibili bassi livelli di inquinamento, per ottenere dei valori minimi di riferimento. Se il campionamento adottato non prevede stazioni del genere, queste vanno utilizzate soltanto a scopo di confronto; se non reperibili nell'area di studio, possono venir localizzate in aree adiacenti con simili condizioni climatiche e soprattutto geologico-pedologiche.

E' consigliabile campionare i talli tutt'attorno al tronco; nel caso però di alberi in prossimità di strade o altre fonti di disturbo, vanno campionati preferenzialmente i talli sulle parti dei tronchi opposte ad esse, a meno che l'obiettivo non sia quello di monitorare gli effetti delle emissioni dovute al traffico veicolare.

Quando l'obiettivo è il monitoraggio di deposizioni aerodiffuse, i talli devono essere campionati al di sopra dei 100 cm dal suolo (sino a 2 m), per evitare contaminazioni terrigene. Se invece l'obiettivo è valutare la contaminazione terrigena (p.es. nel caso di emissioni da discariche a cielo aperto) è invece preferibile campionare i talli alla base degli alberi. In uno stesso studio i licheni vanno comunque campionati ad altezze simili.

I talli vanno prelevati con un temperino in acciaio inossidabile ed il materiale va inserito in una busta di carta da filtro, preventivamente analizzata per verificare l'assenza di contaminazione o in una Petri che però in laboratorio dovrà essere tenuta aperta per permettere il perfetto disseccamento (in condizioni ambientali idonee) del materiale, e quindi richiusa.

Vanno campionate soltanto le parti periferiche dei talli, cioè quelle di più recente crescita (ca. 1.5-2 mm dal margine esterno del tallo in *Xanthori*, ca. 2-4 mm dal margine esterno del tallo in *Parmelia*, in questo caso corrispondenti alle porzioni più chiare o con rizine assenti o in formazione). Se possibile, questa operazione va effettuata in campo in maniera approssimata (per ridurre al minimo l'impatto sulla biodiversità lichenica); altrimenti il tallo lichenico viene raccolto *in toto* e i prelievi vengono effettuati in laboratorio. Per ottenere un dato più significativo, il campione deve provenire da almeno cinque talli raccolti su non meno di tre alberi diversi. Il materiale deve consentire, dopo la pulitura (v. oltre), di ottenere un campione, da sottoporre ad analisi spettrofotometrica, di peso non inferiore a 200 mg.

Il campionamento va effettuato in condizioni meteorologiche relativamente uniformi e a più di una settimana da giorni con precipitazioni particolarmente intense. Va compilata, per ciascun prelievo, una scheda raccolta dati completa di codice identificativo, localizzazione, descrizione della stazione, e data del campionamento e, per ciascun tallo campionato: a) specie di albero e specie di lichene, b) circonferenza del tronco misurata nel punto di raccolta del tallo, c) altezza dal suolo ed esposizione del tallo, d) diametro approssimativo del tallo (per talli di forma irregolare dare una misura media), e) eventuale presenza di danneggiamenti (S: scolorimento del tallo, D: danni meccanici, N: necrosi del tallo). L'intensità del danneggiamento può essere valutata secondo scale semi-quantitative (e.g.: 1 = debole, 2 = medio, 3 = forte).

### **Preparazione del materiale per le analisi chimiche**

In laboratorio, i talli vanno ripuliti al microscopio binoculare per eliminare materiali estranei (max. 7 giorni dopo la raccolta); va prestata la massima attenzione per evitare ogni tipo di contaminazione da metalli in traccia.

Anche quando siano state campionate soltanto le parti periferiche dei talli, è comunque necessario effettuare in laboratorio una accurata selezione di tutti i frammenti sotto il binoculare, curando che le distanze dal margine dei talli seguano le norme di cui al punto 3.8.

Il campione da sottoporre ad analisi deve consistere in un miscuglio di materiale proveniente da tutti i talli campionati. Il materiale ripulito va essiccato a temperatura ambiente ( $H_2O$  residua < 3%), in quanto l'essiccamento in stufa determina la parziale volatilizzazione di alcuni metalli, quali il mercurio, con bassa tensione di vapore; alternativamente, si può utilizzare un essiccatore, senza superare la temperatura di 40°C.

Prima del trattamento chimico, il materiale va polverizzato ed omogeneizzato evitando frammenti maggiori di 0.25 mm. La polverizzazione va effettuata evitando contaminazione da metalli (p. es. in un mortaio d'agata). Per le procedure di determinazione analitica si rimanda all'apposita sezione.

### **3.4.3 BIOACCUMULO TRAMITE TRAPIANTI LICHENICI**

Il ricorso a trapianti di specie raccolte in aree non contaminate risulta il mezzo più pratico per l'effettuazione di indagini di bioaccumulo in vari casi: totale assenza di flora lichenica, assenza di specie foliose, ma anche fruticose, generalmente utilizzate per il bioaccumulo, studi ripetuti nel tempo, necessità di conoscere l'esatto tempo di esposizione, opportunità di avere materiale di partenza omogeneo, esigenza di seguire un disegno di campionamento specifico, campionamento di aree estese con una singola specie. I trapianti dovrebbero inoltre garantire il vantaggio di conoscere le concentrazioni di partenza prima dell'esposizione.

Uno dei sistemi più pratici e comunemente utilizzati per trapiantare il materiale raccolto nelle aree incontaminate è l'esposizione di "lichen bags" (si veda la sezione 3.4.3) che consistono in reticelle, generalmente di nylon, a maglia non troppo fitta, all'interno delle quali vengono posizionati uno o più talli. Tuttavia, questo metodo ha lo svantaggio di interferire potenzialmente con l'intercettazione di particolato in quanto, come osservato mediante microscopia elettronica a scansione la reticella stessa può intrappolare una certa quantità di particelle. Per ovviare a questo inconveniente è preferibile non utilizzare reticelle (bags), ma trapiantare direttamente il materiale, senza staccarlo dai substrati (in genere porzione di ramo) con cui è stato raccolto. In genere le porzioni di ramo vengono adeguatamente raccorciate, quindi fissate con stringe autobloccanti di materiale plastico ad una bacchetta di canna d'India o bambù che verrà fissata a sua volta ad un adeguato supporto. In altri casi i campioni, staccati dal substrato, possono essere fissati con sottile filo di nylon a un tubetto di materiale plastico che viene quindi infilato su un'asta di acciaio. Nella fase di preparazione i campioni vanno ripuliti allo stereomicroscopio da materiale estraneo quale muschi, altre specie licheniche, ecc.

### **Selezione delle specie da utilizzare**

Nonostante le specie foliose siano quelle più utilizzate per studi *in situ*, quando si fa ricorso all'utilizzo di trapianti, la possibilità di prelevare il materiale da aree non contaminate, la facilità di raccolta e pulizia dei campioni e la maggior maneggevolezza dei talli inducono ad orientarsi verso specie fruticose. Le più utilizzate sono senza dubbio *Evernia prunastri* e *Pseudevernia furfuracea*.

### **Raccolta e trattamento dei campioni**

I talli vanno raccolti in aree non o poco contaminate prelevando *in toto* la porzione terminale dei rami o rametti su cui si trovano. I talli così raccolti, nell'attesa di essere trapiantati, vanno trasportati all'interno di sacchetti di carta per alimenti oppure di nalophane (che non interferisce con il contenuto di inquinanti organici volatili dei campioni).

Poiché, per motivi di tempo, spesso risulta difficile effettuare il trapianto il giorno stesso della raccolta, è consigliabile, nel frattempo, mantenere i talli lichenici in condizioni ambientali stabili. Il materiale dovrebbe essere collocato in una cella climatizzata in condizioni di temperatura, illuminazione e umidità relativa controllate; in tal caso condizioni standard possono essere: 15°C, 40-150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 50-60% di umidità relativa. In alternativa i campioni si possono lasciare a temperatura ambiente in prossimità di una finestra, possibilmente non esposti a luce diretta, lontano da fonti di calore e, ovviamente, da sorgenti di inquinamento.



### **Prelavaggio dei campioni**

Se le esigenze e le finalità dell'indagine lo richiedono, si può procedere a prelavaggi dei campioni, mirati a rimuovere la componente particellata (in aree remote consistente perlo più di particelle di suolo) dalla superficie dei talli.

Le tecniche di prelavaggio più comunemente utilizzate consistono in 1-2 lavaggi di 30-40 minuti ciascuno in acqua deionizzata, oppure in lavaggi di 1-2 minuti con acqua a caduta introducendo il materiale in un colino di materiale inerte. Un metodo estremamente efficace consiste in un bagno ad ultrasuoni di 10-15 minuti.

### **Trapianto e allestimento dei campioni**

I campioni da trapiantare vanno trasportati nella loro destinazione finale all'interno dei sacchetti. I campioni vanno assicurati in posizione naturale ad una altezza di c. 4 m dal suolo, su supporti appositamente allestiti oppure all'estremità dei rami degli alberi (purché il materiale non sia coperto dalle parti sovrastanti della chioma) o su supporti quali pali della luce o della corrente (meglio se di cemento o di legno). In questi ultimi casi bisogna stare attenti alla posizione del materiale rispetto ai sovrastanti fili elettrivi.

### **Recupero dei campioni**

I campioni trapiantati vanno recuperati dopo un tempo di esposizione variabile, generalmente entro i 3 mesi, ma comunque funzionale agli scopi dell'indagine; nel caso di esposizioni plurime condotte in parallelo e di durata diversa si suggerisce di usare come unità di tempo la settimana. Una volta staccati dai supporti, i campioni raccolti vanno messi all'interno di buste o sacchetti di carta o di nalophane, assieme a un cartellino con le indicazioni della stazione e qualunque altra annotazione possa risultare utile. I campioni vanno quindi trasportati in laboratorio sempre all'interno dei sacchetti di carta o di nalophane.

### **Trattamento dei campioni e analisi chimiche**

In laboratorio i campioni vanno essiccati o all'aria o in stufa, possibilmente ventilata, a 40°C per 24-48 ore. Nell'evenienza che non ci sia la possibilità di procedere immediatamente con le analisi chimiche, i campioni vanno conservati in congelatore a -20°C, eventualmente dopo aver prelevato per le successive analisi con forbici di porcellana solo le porzioni più distali delle lacinie, di lunghezza standard.

In dipendenza delle finalità dell'indagine, si tratterà il campione tal quale oppure si procederà a effettuare lavaggi con acqua deionizzata (per rimuovere eventuali particelle semplicemente depositate sulla superficie dei talli) o anche eluzioni sequenziali con acqua deionizzata,  $\text{NiCl}_2$  e  $\text{HNO}_3$  per discriminare rispettivamente tra le componenti particellata esterna e/o solubile, extracellulare, intracellulare e particellata interna ed insolubile.

I campioni di lichene essiccati all'aria hanno generalmente un contenuto di acqua residua inferiore al 10% e spesso il peso secco viene riferito a tale stadio. Per determinare il peso secco in maniera più accurata, un'aliquota dei talli va separata e posta in stufa a 80-110°C per 24 ore. Idealmente il peso secco andrebbe determinato non sui talli ma sulla polvere da essi ottenuta (vedi oltre).

Per ottenere del materiale omogeneo per le analisi, i campioni vanno polverizzati. Tale processo viene facilmente ottenuto tramite mortaio e pestello di ceramica, grazie all'aggiunta di una modica quantità di azoto liquido. In alternativa, quando le quantità di materiale sono abbondanti, si può utilizzare anche un mulino a lame di acciaio o a palle di materiale inerte.

Per la mineralizzazione dei campioni viene generalmente utilizzato  $\text{HNO}_3$ , talvolta in combinazione con  $\text{H}_2\text{O}_2$  nella proporzione di 6:1 (v/v). Tale procedimento è sufficiente per solubilizzare le matrici biologiche. Tuttavia, in dipendenza delle esigenze e delle finalità dell'indagine, talvolta viene aggiunto anche HF alla miscela acida, favorendo così la solubilizzazione anche delle particelle resistenti al trattamento con  $\text{HNO}_3$  (ad es. minerali silicei).

#### **3.4.4 BIOACCUMULO TRAPIANTI *MOSS- O LICHEN-BAGS***

La necessità con alcuni materiali usati nei trapianti di trattenerli fisicamente in un materiale che interferisca il meno possibile con i fenomeni di scambio tra materiale ed atmosfera ha suggerito l'adozione delle cosiddette "bags". La differenza sostanziale con i trapianti tradizionali è che in questa tecnica in genere nella bag si introduce materiale già selezionato e pulito, spesso ad esempio solo parte terminale dei gametofori di muschio o l'estremità delle lacinie di un lichene. Tale materiale nel corso del processo deriva da molti campioni che sono stati adeguatamente preparati e reso quindi il più possibile omogeneo.

La tecnica è nata originariamente in campo biologico ed è stata impiegata in maniera continuativa a partire dagli anni '70 (Goodman e Roberts, 1971). In letteratura sono ormai disponibili numerosi lavori che affrontano aspetti applicativi, metodologici e critici dell'uso delle moss-bags, che sono basate essenzialmente su materiale di muschio (soprattutto *Sphagnum* spp., *Hypnum cupressiforme* e *Scleropodium purum*), pulito e lavato in maniere diverse, ed esposto in sacchetti di materiale plastico. In seguito, come per i muschi, anche per i licheni sono stati proposti diversi tipi di allestimento dei campioni, che differiscono per tipo di pulizia e lavaggio del materiale, quantità di materiale esposto, modalità e tempi di esposizione. Mikhailova (2002) sintetizza alcune linee-guida per l'allestimento di lichen-bags, come la selezione di un'unica specie, facilmente collezionabile, trapiantabile ed osservabile, la raccolta di talli lichenici di dimensioni simili che crescono su uno stesso substrato, e l'adozione di tempi di esposizione brevi (1-3 mesi) per evitare danni al materiale esposto; purtroppo molti punti cruciali, come la quantità di materiale da mettere nei sacchetti, le dimensioni dei talli collezionati, le modalità di allestimento ed esposizione dei bags non sono ben definiti.

Le principali differenze tra trapianti e lichen-bags riguardano l'omogeneità del materiale e l'interferenza della reticella nell'esposizione. Nei trapianti (talli esposti con il substrato) si cerca di mantenere la completa integrità e funzionalità dei talli, evitando danni ed alterazioni legati alla raccolta, trattamento ed esposizione del materiale. Il materiale però mantiene anche la sua originale variabilità, e questo può giocare un ruolo rilevante nei dati di accumulo finali, soprattutto se il materiale di partenza è eterogeneo (talli di diversa età) e le analisi vengono effettuate su pochi talli interi. Nei lichen-bags, i licheni possono subire trattamenti anche molto drastici, quali l'asportazione dal substrato di crescita, lavaggi ripetuti in acqua distillata o in

soluzioni acide, o la selezione di parti dei talli. La possibilità di pulire, lavare, selezione e rimescolare accuratamente numerosissimi talli per formare un unico campione composito porta all'indubbio vantaggio di ridurre la variabilità del materiale di partenza, facilitando la definizione dei livelli di accumulo pre-esposizione e riducendo la variabilità dei dati post-esposizione.

L'adozione della reticella di materiale plastico per esporre il materiale può influenzare l'accumulo di elementi in traccia, che sono soprattutto associati al particolato atmosferico: la reticella può ostacolare il passaggio di particolato, oppure trattenerlo ed accumularlo sulla sua superficie, per poi rilasciarlo alla prima pioggia nel materiale. In uno studio triennale su trapianti di *Hypogymnia physodes* lungo il Lago Michigan, il confronto tra lichen-bags e talli trapiantati mostra un arricchimento per 7 elementi su 20 nei lichen-bags, e differenze non significative per tutti gli altri (Bennett et al., 1996). La presenza di una retina a maglie non troppe larghe può inoltre in parte proteggere il materiale dall'effetto delle piogge, riducendo la possibile perdita di elementi per dilavamento. Esperimenti molto articolati condotti con il muschio *Pseudoscleropodium purum* non hanno invece individuato differenze significative tra moss-bags fatte con reticelle di magli 1,2 e 4 mm esposte in diversi scenari espositivi (urbani, agricoli e industriali) nella Spagna atlantica, in Austria e in Italia meridionale (Capozzi et al., in prep.)

Muschi e licheni possiedono entrambi una grande capacità di accumulo, determinata fondamentalmente dalla loro dipendenza diretta dalle deposizioni atmosferiche per l'apporto di nutrienti, ma sono organismi estremamente diversi, dall'organizzazione del tallo fino alla fisiologia. Attualmente, la scelta di utilizzare muschi o licheni nel biomonitoraggio sia attivo che passivo dipende essenzialmente dalla disponibilità di materiale e dalla dimestichezza con un certo tipo di indicatore. Nel caso dei bags, un confronto diretto tra moss-bags realizzati con *Hypnum cupressiforme* e lichen-bags realizzati con *Pseudevernia furfuracea* secondo analoghe modalità suggerisce una maggiore capacità di accumulo del muschio rispetto al lichene (Adamo et al., 2007), anche se i campioni di muschio esposti mostrano danni maggiori rispetto al lichene (Tretiach et al., 2007): i lichen-bags, per lo meno se realizzati secondo le procedure indicate di seguito, sembrano essere più resilienti all'esposizione, ma meno efficienti come capacità di accumulo rispetto ai moss-bags.

Sulla base della vasta letteratura disponibile su moss-bags, trapianti di licheni, e di uno specifico progetto di ricerca nazionale avviato nel 2002 che ha coinvolto le Università di Trieste, Siena, Genova e Napoli (Tretiach et al., 2007; Adamo et al., 2007, Giordano ed al. 2009, 2013), viene proposto un protocollo per la preparazione e l'impiego di moss- e lichen-bags per la valutazione delle deposizioni atmosferiche di elementi in traccia, in cui l'elemento forse più innovativo è la proposta di utilizzare nel caso del muschio materiale devitalizzato in seguito a trattamento termico. I muschi trapiantati infatti soffrono molto le condizioni ecologiche a cui si trovano esposti, assolutamente innaturali, tanto che la loro vitalità è in genere severamente compromessa. La devitalizzazione permette di risolvere alla radice il problema, riducendo anche le problematiche di conservazione del materiale dopo la sua raccolta in campo. Inoltre la devitalizzazione non compromette le capacità di accumulo degli elementi in traccia, in quanto nei trapianti predominano di gran lunga

i fenomeni passivi su quelli attivi. Il protocollo riprende le linee-guida ANPA già delineate per i moss-bags da [Castello et al. \(1999\)](#). La preparazione dei lichen-bags proposta in questo protocollo ha lo scopo principale di ottenere un'elevata omogeneità del materiale, mediante un'accurata pulizia, selezione e lavaggio dei talli lichenici, in modo da ridurre la variabilità caratteristica di qualsiasi materiale biologico, in questo caso sia a livello di contenuto di elementi in traccia che delle caratteristiche della superficie del materiale lichenico utilizzato.

I dati ottenuti con l'esposizione dei lichen-bags servono a definire in maniera quantitativa lo stato della qualità dell'aria relativo ad elementi in traccia associati a particellato di un'area omogenea dal punto di vista climatico.

### **Scelta della specie**

La specie lichenica scelta per i lichen-bags è il lichene fruticoso *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea*, un lichene epifita estremamente comune in Europa, dove mostra una distribuzione principalmente temperato-boreale; in Italia è molto diffuso, soprattutto in aree montane. È una specie in grado di tollerare situazioni di inquinamento atmosferico. Si tratta di una specie di facile riconoscimento, già utilizzata in studi di bioaccumulo sia tramite materiale autoctono che tramite trapianti in Italia e relativamente ben nota anche dal punto di vista fisiologico.

La specie muscicola di riferimento per i moss bags è il muschio pleurocarpo *Hypnum cupressiforme* Hedw., una specie molto comune e facilmente reperibile, ma altrettanto frequentemente usati sono *Pseudoscleropodium purum* e diverse specie di *Sphagnum* la cui reperibilità è però problematica per motivi conservazionistici.

Le sezioni che seguono, relative alla raccolta, conservazione e trattamento pre-esposizione del materiale biologico, incluso l'allestimento dei bags, si riferiscono a lichen e moss bags preparati con materiale naturale, prelevato in campo. Esiste un'alternativa recentemente implementata e commercializzata, prodotto del progetto di ricerca FP7 MossClone ([www.mossclone.eu](http://www.mossclone.eu)), la cosiddetta *MosSphere*, che consiste in un involucro sferico in materiale plastico traforato, contenente materiale muscinale della specie *Sphagnum palustre* coltivato in forma clonale in bioreattori in condizioni altamente standardizzate e successivamente devitalizzato. Questa innovazione consente, in aggiunta a un risparmio di tempo e risorse, di ottenere campioni da esposizione assolutamente omogenei per caratteristiche morfologiche e capacità di accumulo e con valori estremamente bassi di elementi e PAHs (da 10 a 100 volte quelli misurati in materiali raccolti in natura in siti naturali).

### **Raccolta del materiale**

La raccolta del materiale per la preparazione dei bags va fatta preferibilmente in un'unica giornata. La stazione di raccolta deve essere localizzata in un'area lontana da aree antropizzate e non impattata da evidenti fenomeni di inquinamento atmosferico, anche legati a deposizioni su ampia scala di inquinanti atmosferici; vanno scartate anche aree con anomalie geo-litologiche.

Il materiale viene prelevato indossando guanti in lattice dai rami bassi di alberi preferibilmente della stessa specie, posti ad un'altezza di 1,5-3 metri dal suolo. Tutto il materiale viene posto in uno o più sacchi di carta per alimenti dello stesso tipo e portato in laboratorio. Evitare di collezionare materiale bagnato o molto umido, per evitare la formazione di muffe. La quantità di materiale da raccogliere va stimata considerando i seguenti punti:

in ogni bag vanno posti un minimo di 500 mg di materiale secco, costituito, nel caso di lichen bags, solo dalle parti terminali dei talli lichenici, e non dai talli completi (vedi oltre). Nel caso di moss-bags, dalle porzioni terminali dei fusticini (cauloidi o gametofori) corrispondenti a 1-2 cm di lunghezza.

Si deve stabilire in anticipo il numero totale di bags che verranno esposti nell'indagine, definendo il numero di stazioni di esposizione ed il numero di eventuali repliche per stazione. A questo è consigliabile aggiungere ulteriori campioni, da collocare in alcune stazioni aggiuntive o come duplicati extra di riserva in una stessa stazione, per compensare eventuali perdite di campioni dovute a fattori accidentali (vento, rotture o asportazione dei supporti, danni da animali, ecc.) o ad atti di vandalismo (purtroppo non rari, soprattutto in ambiente urbano). Ulteriore materiale serve per conoscere i valori di concentrazione pre- esposizione, considerando che vanno analizzati uno o più campioni di ca. 200 mg ciascuno (peso secco), che vengono prelevati dal materiale pronto per l'esposizione.

### **Conservazione del materiale**

Si consiglia di ridurre al minimo il periodo tra raccolta ed esposizione dei lichen-bags (pochi giorni). In alternativa, è possibile conservare per tempi lunghi (qualche mese al massimo) il materiale ottenuto nelle fasi di raccolta e trattamento o i bags allestiti mediante congelamento: il materiale deve essere ben secco (eventualmente essiccato in un ambiente con bassa umidità atmosferica relativa) per evitare danni legati al congelamento, e va posto in sacchetti di plastica e conservato in congelatore a  $-35^{\circ}\text{C}$ . L'eventuale materiale devitalizzato non presenta particolari problemi di conservazione.

### **Trattamento del materiale**

Tutte le fasi della preparazione dei campioni da esporre vengono fatte indossando guanti in lattice, risciacquati con acqua distillata.

La fase di preparazione dei campioni (bags) dovrebbe avvenire entro 1-3 giorni dal campionamento. Una volta raccolto, il materiale, se secco, può essere conservato in laboratorio nei sacchetti di carta lasciati aperti in attesa della fase di allestimento dei campioni, altrimenti va disteso su ripiani ricoperti da fogli di plastica (per alimenti) se ancora umido e lasciato asciugare all'aria. Conservare il materiale evitando qualsiasi forma di contaminazione.

Il materiale raccolto viene disteso su un ripiano ricoperto da fogli di plastica, e viene sottoposto ad una pulizia grossolana e alla selezione delle parti dei talli da inserire nei sacchetti (bags). La pulizia viene fatta ad occhio nudo o con un microscopio binoculare e con l'ausilio di pinzette in acciaio inossidabile: vengono rimossi pezzi di

corteccia, foglie, terriccio e altri elementi estranei al materiale, tra cui i talli di altri licheni eventualmente presenti.

Per ottenere materiale omogeneo, dai talli lichenici vengono prelevate soltanto le parti apicali dei lobi, corrispondenti agli ultimi 25-30 mm dei lobi. Le parti vengono spezzate con le dita. Vanno scartate parti del tallo danneggiate, necrotiche, decolorate o brunastre, e quelle ricoperte da alghe. Vanno inoltre escluse le parti con forte copertura di isidi, quelle con scarsa presenza di isidi, e quelle con apoteci, per ottenere materiale con simili caratteristiche della superficie. Nel caso di moss-bags, vanno separati i fusticini di colore verde da quelli di colore bruno, mentre vanno rimosse le parti molto sporche di terriccio, ove presenti.

Il materiale così selezionato viene mescolato e riunito a formare un unico campione, e, ormai seccato all'aria, viene pesato per verificare la disponibilità di una quantità sufficiente per l'indagine. Il materiale viene quindi sottoposto ad un trattamento di reidratazione, volto alla riduzione dei possibili danni legati alle successive operazioni di lavaggio. Il materiale viene posto in una camera umida per almeno 12 ore. La camera umida può essere realizzata facilmente utilizzando un contenitore di plastica con coperchio di dimensioni adatte: versare sul fondo del contenitore acqua fino a raggiungere un paio di centimetri di livello; appoggiare sul fondo alcuni bicchieri rovesciati sui quali sistemare un supporto rigido in plastica (vassoio, foglio, o rete a maglia stretta); collocare il materiale da reidratare sul supporto; quindi chiudere il coperchio.

Il materiale reidratato viene sottoposto al lavaggio. La procedura del lavaggio prevede l'esecuzione di ripetuti lavaggi in acqua distillata: per ogni lavaggio si consiglia l'impiego di 10 litri di acqua distillata per 100 g di peso secco di materiale. Il materiale viene posto in un unico recipiente in plastica contenente acqua distillata, viene delicatamente agitato, lasciato nell'acqua per un certo tempo e quindi rimosso, per essere sottoposto al lavaggio successivo con altra acqua. Si consiglia di effettuare 4 lavaggi successivi, della durata rispettivamente di 20, 15, 10 e 5 minuti. I ripetuti lavaggi assicurano una maggiore efficienza nella rimozione di particolato presente sulle superfici dei talli e di metalli associati alle pareti cellulari.

Al termine del lavaggio il materiale viene delicatamente centrifugato a mano con una centrifuga in plastica, disteso su un ripiano ricoperto da fogli di plastica e lasciato asciugare all'aria per uno o più giorni.

### **Allestimento delle bags**

Le bags vengono realizzate usando pezzi di rete di materiale plastico di 12 x 12 cm, con maglia di 1.5-2 mm (tipo zanzariera), chiusi con un filo di nylon sottile fatto passare lungo i bordi, per formare sacchetti sferici aventi diametro di 3,5-4 cm. I pezzi di rete vanno lavati per due volte in acqua distillata e lasciati asciugare all'aria.

In ogni sacchetto si pongono 500 mg di materiale lichenico secco. Il materiale non deve venir compresso nel sacchetto, per consentire la circolazione dell'aria anche

nelle parti centrali del campione. Le fasi di trattamento e allestimento dovrebbero avere una durata complessiva non superiore ai 7 giorni.

### **Esposizione delle bags**

E' consigliabile esporre le lichen-bags entro 1-3 giorni dall'allestimento. In alternativa, è possibile conservarli in congelatore a  $-35^{\circ}\text{C}$ .

L'esposizione delle bags deve avvenire nel più breve tempo possibile: si consiglia di esporre le bags nell'ambito dell'area di studio nell'arco delle 24 ore prendendo nota della sequenza di esposizione, con condizioni di tempo stabile.

In ogni stazione di esposizione le bags vanno collocate ad un'altezza di 4 m dal suolo per evitare eventuali contaminazioni terrigene (questa è anche l'altezza standard imposta da molti regolamenti comunali per l'esposizione di materiali su pali della luce e della corrente elettrica; si consiglia sempre di verificare con i gestori delle reti la loro disponibilità ad "ospitare" il materiale sulle loro strutture).

I campioni vanno esposti in posizioni aperte, evitando la prossimità di edifici alti, siepi o boscaglie fitte. Si deve evitare di posizionare i campioni in prossimità di strade (vedi il capitolo sulla strategia di campionamento con licheni autoctoni), a meno che non sia previsto un monitoraggio specifico di tali aree. Se lo studio viene realizzato nei centri urbani, si può invece scegliere di esporre i bags nei piani bassi di edifici, utilizzando supporti adeguati sporgenti da davanzali o balconi per 1-2 m.

Se il supporto per i bags è costituito da alberi, ci può essere un'influenza della chioma sulle deposizioni. Nella stagione autunnale ed invernale utilizzare preferibilmente le latifoglie, che, grazie alla caduta delle foglie, offrono naturalmente condizioni di esposizione ottimali e risultano comparabili ai supporti artificiali. Altrimenti i campioni vanno attaccati ai rami più esterni di arbusti o piccoli alberi, possibilmente isolati e con chioma rada, evitando le zone ad elevata densità fogliare; in alternativa si può rimuovere la copertura fogliare sovrastante.

E' consigliabile che in uno studio venga seguita un'unica modalità di esposizione. Evitare di esporre le bags durante periodi con forti precipitazioni temporalesche. In ciascuna stazione di campionamento si possono collocare da 1 a 4 lichen-bags. Si consiglia di collocare più di una bag per stazione, per ridurre le possibili variazioni nelle concentrazioni di metalli nei campioni esposti: a questo scopo i campioni vanno collocati a poca distanza gli uni dagli altri (entro un raggio massimo di 50 metri), in identiche condizioni di esposizione, per evitare variazioni di accumulo legate a diverse modalità di esposizione. Se possibile, nella successiva fase di analisi, analizzare separatamente i diversi campioni e calcolare i valori di deposizione della stazione come media dei singoli valori ottenuti; altrimenti riunire il materiale delle singole bags in un unico campione da sottoporre ad analisi (vedi oltre). E' comunque possibile utilizzare anche una singolo lichen-bag esposta per caratterizzare la stazione. Collocare eventualmente campioni aggiuntivi per compensare le possibili perdite accidentali o atti di vandalismo.

Il periodo di esposizione delle bags va da un minimo di 3 settimane ad un massimo di 3 mesi (12 settimane); il periodo consigliato è di 6 settimane, per evitare fenomeni di saturazione nell'accumulo, variazione dei dati dovuti all'alterazione del materiale e l'influenza dei cambiamenti climatici legati alle stagioni.

La raccolta dei campioni deve seguire la stessa sequenza temporale della collocazione, affinché ogni lichen-bag rimanga esposta per lo stesso periodo di tempo. Se nei giorni immediatamente precedenti la fine dell'esposizione si verificano forti precipitazioni, si consiglia di rinviare il ritiro dei campioni, effettuandolo 7 giorni dall'evento. Inserire ogni bag ritirata in una busta di carta o di nalophane, indicando i dati del campione sulla bustina. Utilizzare buste identiche per tutti i campioni.

### **Preparazione delle bags per le analisi chimiche**

La preparazione per le analisi chimiche va effettuata su tutto il materiale chiuso nella bag se si analizzano singoli campioni. Se si decide di analizzare i diversi campioni esposti nella stazione con un'unica misura, riunire tutto materiale chiuso nei singoli sacchetti in un unico campione. Si sconsiglia di prelevare solo una parte del materiale esposto nei singoli campioni.

Le fasi di preparazione ed analisi seguono le procedure indicate nell'apposita sezione di questo documento, sintetizzate come segue: il materiale non viene lavato; tutto il materiale dei campioni singoli o compositi viene tritato con un mortaio d'agata o con un coltello in ceramica e ridotto a polvere fine; il materiale tritato viene conservato in identiche bustine di carta in attesa delle analisi.

#### **3.4.5 Bioaccumulo tramite muschi *in situ***

La tecnica di bioaccumulo tramite muschi *in situ* epifiti è attualmente normata a livello europeo dallo standard EN 16414 "Ambient air - Biomonitoring with mosses - Accumulation of atmospheric contaminants in mosses collected in situ: from the collection to the preparation of samples", che codifica le procedure di campionamento e preparazione dei campioni per la determinazione analitica di contaminanti. Alla progettazione, stesura ed approvazione di questo standard Europeo ha partecipato attivamente il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste, mediante adeguata rappresentanza nell'ambito del gruppo di esperti facenti parte del WG31 della TC264 del CEN (Comité Européen de Normalisation). Tuttavia, il metodo è scarsamente utilizzato a livello nazionale, data la scarsità di specie idonee naturalmente presenti in siti solitamente oggetto di indagini di biomonitoraggio, ove si privilegia l'utilizzo di trapianti o bags.

La norma tecnica descrive dettagliatamente le procedure di campionamento e la preparazione dei campioni per la determinazione del bioaccumulo di contaminanti aerodispersi. Per il dettaglio dei protocolli operativi si rimanda al documento tecnico originale ([CEN 2014b](#)), che è disponibile in vendita presso gli enti di normazione nazionali di tutti i paesi europei, ma non liberamente distribuibile, né *in toto* né in parte



### 3.4.6 DETERMINAZIONE ANALITICA DI ELEMENTI IN TRACCIA

Usualmente si associa alla fase di analisi chimica dei campioni il minore effetto sulla variabilità del dato di bioaccumulo degli elementi in traccia (Bargagli, 1998). In realtà le scelte metodologiche e le tecniche di esecuzione possono essere causa di problemi di non secondaria importanza.

I punti critici del processo analitico sono essenzialmente rappresentati dai metodi di digestione acida, dalle tecniche di determinazione, oltre che dalla garanzia di qualità del laboratorio di analisi.

La maggior parte dei lavori di bioaccumulo di elementi in traccia condotti in Italia hanno utilizzato la tecnica di digestione parziale ( $\text{HNO}_3$  oppure  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ ) che è caratterizzata da percentuali di recupero (quantità di elemento solubilizzata rispetto alla sua quantità totale presente nella matrice) variabili in funzione dell'elemento, del contenuto della matrice da analizzare (particolato antropogenico, particolato terrigeno, ecc.) e delle condizioni di mineralizzazione (tempi di mineralizzazione, temperatura, granulometria del materiale macinato ecc.). In particolare, la percentuale di recupero per alcuni elementi terrigeni risulta decisamente ridotta. In **Tabella 5** vengono mostrate le percentuali di recupero ottenute da alcuni autori che hanno analizzato materiale vegetale a contenuto certificato.

**Tabella 5.** Percentuali di recupero critiche in materiale certificato

Elemento	$\text{HNO}_3$	$\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$
Al	68 % [1] $74 \pm 11$ % [2]	54% [3]
Cr	75% [1]	53% [3]
Ti*	$75 \pm 15$ % [2]	48% [3]

[1] SRM 1672 Citrus leaves (Bargagli, 1998)

[2] CRM 482 *Pseudevernia furfuracea* (Minganti et al., 2003)

[3] CRM 482 *Pseudevernia furfuracea* (Bettinelli et al., 2002)

\* valore indicativo nel CRM 482 *Pseudevernia furfuracea*

I valori indicati, che sono solo una piccola parte di quelli pubblicati in letteratura, evidenziano la variabilità legata al metodo per gli elementi che normalmente rivestono un ruolo importante nell'interpretazione dei dati di bioaccumulo; Al e Ti, infatti, sono gli elementi di riferimento per la stima dell'inquinamento terrigeno (Fattore di Arricchimento o FA, Bergamaschi et al. 2002).

Inoltre, occorre tenere presente che non si dispone di stime della percentuale di recupero di questo tipo di mineralizzazione effettuate con materiale lichenico certificato ad elevato contenuto di particolato terrigeno. Una parziale indicazione viene fornita da alcuni autori (Bettinelli et al. 2002) che hanno effettuato un confronto tra le concentrazioni ottenute dall'analisi di talli di *Pseudevernia furfuracea*, raccolti in un'area vicina ad una zona mineraria della Sardegna, mediante la mineralizzazione parziale ( $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ ) e la mineralizzazione totale ( $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{HF}$ ); in **Tabella 6** vengono riportate le medie e le deviazioni standard di tutti i valori di concentrazione di alcuni elementi terrigeni ottenuti da due laboratori che hanno analizzato lo stesso materiale. Per altri elementi come Cd, Cu, As, Mn, Pb, Se e Zn non si notano usualmente problemi di recupero.

**Tabella 6.** Valori di concentrazioni in campioni arricchiti di elementi terrigeni, ottenuti con due metodi di digestione acida.

Elemento (metodo di determinazione)	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +HF
Al (ICP-OES)	4532 ± 505 µg/g	7378 ± 682 µg/g
Cr (ICP-OES)	6,35 ± 1,20 µg/g	9,15 ± 0,82 µg/g
Ti (ICP-OES)	68,7 ± 13,7 µg/g	412 ± 19 µg/g
V (ICP-OES)	10,4 ± 0,7 µg/g	14,1 ± 0,5 µg/g

Abitualmente, molti autori hanno stimato il FA applicando la stessa tecnica di mineralizzazione al suolo superficiale raccolto nei pressi del campionamento dei talli lichenici, assumendo che la percentuale di recupero degli elementi sia la stessa che si ottiene con il materiale lichenico. Questo assunto non è vero per diversi elementi. Infatti, materiale lichenico e suolo, raccolti nella stessa area, mineralizzati con HNO<sub>3</sub> e con HNO<sub>3</sub>+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+HF per la successiva determinazione del contenuto totale hanno mostrato che la mineralizzazione parziale del lichene consente percentuali di recupero diverse da quelle ottenute con lo stesso metodo per il suolo (Bettinelli et al., 2002). Questo si traduce generalmente in una sovrastima del FA per diversi elementi (Tabella 7).

**Tabella 7.** Esempi di concentrazioni ottenute con le due tecniche di digestione sui medesimi campioni e relativo fattore di arricchimento (FA).

Elemento	Mineralizzazione	Matrice		FA
		Lichene (µg/g)	Suolo (µg/g)	
Ti	senza HF	69	412	-
	con HF	180	699	-
Cd	senza HF	4,12	0,37	29,2
	con HF	4,55	0,36	21,4
Pb	senza HF	43,9	9,78	11,8
	con HF	43,3	12,6	5,8
Zn	senza HF	158	25,5	16,2
	con HF	168	49,5	5,5

Oltre al problema del particolato terrigeno e della stima del FA, occorre considerare che alcune tipologie di particolato di origine antropica (es. ceneri volatili da combustione) non sono digeriti in modo soddisfacente con l'HNO<sub>3</sub>. La mineralizzazione parziale, inoltre, risente maggiormente della variabilità delle condizioni adottate per il processo e, quindi, influenza sia la ripetibilità che la riproducibilità (Bettinelli et al., 2002).

Non secondaria, infine, è la scelta del metodo di determinazione (tecnica utilizzata per la determinazione degli elementi nella soluzione ottenuta dalla mineralizzazione del campione) che risulta importante per l'accuratezza del dato finale.

Al fine di ovviare ai problemi sopra descritti e di aumentare la confrontabilità dei dati prodotti da diversi laboratori e, quindi, a livello nazionale, si ritiene opportuno proporre come metodo di riferimento la digestione totale in presenza di HF, come raccomandato da Quevauviller et al. (1992). Questa tecnica è poco influenzata dalle condizioni di digestione poiché l'utilizzo di HF consente una completa dissoluzione di

tutte le matrici coinvolte nel processo (materiale vegetale, particolato terrigeno e particolato di origine antropica) aumentando la ripetibilità e la riproducibilità. Il protocollo analitico descritto nei paragrafi successivi propone le tecniche di determinazione da adottare per ogni singolo elemento considerato.

### **Preparazione del campione**

Il campione preparato al microscopio binoculare (selezione delle parti di tallo corrispondenti alla crescita dell'ultimo anno, eliminazione di particelle di suolo, di residui di corteccia etc.), deve essere essiccato a temperatura inferiore a 40°C per almeno 24 ore in contenitori di polietilene.

Successivamente si procede alla macinazione ed omogeneizzazione del materiale: questa operazione è effettuata in mulino orbitale a 4 palle (minimo 3 palle) con mortaio di agata per limitare i problemi di contaminazione da elementi metallici. Il ciclo di macinazione dura circa 45 minuti. In alternativa, è possibile utilizzare anche un macinatore criogenico ad azoto liquido, che impedisce il surriscaldamento del campione e la possibile perdita di elementi volatili. In tal caso, il ciclo di macinazione prevede tre fasi di due minuti ciascuna, intervallate da periodi di raffreddamento di 5 minuti.

Entrambi i metodi di macinazione garantiscono una granulometria massima di 200 µm. I materiali così preparati vengono conservati in contenitori di polietilene (sacchetti o bottiglie) a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi. Le operazioni di preparazione devono essere effettuate indossando guanti monouso non talcati al fine di ridurre le probabilità di contaminazione.

### **Digestione acida dei campioni**

I campioni preparati come discusso al punto precedente vengono sottoposti a digestione acida in forno a microonde con miscela di acido nitrico (7 ml), fluoridrico (0,2 ml) ed acqua ossigenata (1 ml), secondo la procedura descritta di seguito.

Una quantità accuratamente pesata di campione compresa tra 0,2 e 0,3 g è posta negli appositi contenitori ad alta pressione (max 150 bar) del forno a microonde, possibilmente provvisto di controllo di temperatura. A tale proposito, è opportuno utilizzare sempre contenitori dedicati alla digestione di campioni a bassa concentrazione di elementi di interesse, evitando, ad esempio, l'utilizzo di contenitori impiegati per le digestioni dei suoli (effetto memoria del Teflon).

Nel caso di forno di digestione sprovvisto di controllo di temperatura, la procedura qui descritta va applicata per la digestione contemporanea di 6 campioni: con un numero di campioni inferiore occorre riempire con acqua i contenitori in eccesso, poiché la temperatura raggiunta dalla soluzione dipende dal numero di contenitori utilizzati contemporaneamente nel forno a microonde. In tali condizioni (numero di campioni e volume di reagenti) la temperatura dei campioni raggiunge al massimo il valore di 200°C. Questo accorgimento non è necessario se si dispone del controllo di temperatura poiché si imposta la temperatura massima a 200°C.

I campioni vengono solubilizzati utilizzando il seguente programma termico con ventilazione per tutta la durata del ciclo:

Potenza (W)	Tempo (min)
240	2
360	2
480	15

Dopo raffreddamento si trasferiscono le soluzioni in matracci tarati di polipropilene o polietilene, portando al volume finale di 25 ml con acqua deionizzata.

### Analisi strumentale

I campioni solubilizzati sono analizzati mediante tecniche spettroscopiche. Le tecniche più adatte per i diversi elementi sono quelle indicate di seguito: spettrometria di emissione al plasma ottico (ICP-OES) per Al, Ba, Ti, Mn, Cr, V, Zn, Fe; spettrometria di emissione al plasma massa (ICP-MS) oppure, in alternativa, GF-AAS con fornello di grafite per Ni, Pb, Cd, Te, Be; assorbimento atomico con fornello di grafite (GF-AAS) o con svolgimento di idruri (HG-AAS) per As e Se; assorbimento atomico accoppiato alla tecnica dei vapori freddi (CV-AAS) o analizzatore AMA 254 per il Hg. Per il Cr a basse concentrazioni può essere utilizzata anche la ICP-MS.

Le determinazioni sono effettuate sulle soluzioni senza diluizione, nel caso di ICP-AES e AAS, e sulla soluzione diluita 10 volte nel caso dell'analisi effettuata mediante ICP-MS, per evitare problemi di occlusione meccanica dello strumento dovuta al carico salino elevato. Di seguito vengono riportate, a scopo indicativo, le condizioni strumentali normalmente utilizzate per le diverse tecniche di determinazione.

**Tab. 8. Parametri strumentali per analisi mediante ICP**

Parametri	ICP-MS	ICP-OES
Potenza	1350 W	1200 W
Flusso di Ar Plasma	16 l/min	16 l/min
Flusso di Ar Ausiliario	0,9 l/min	1 l/min
Flusso di Ar Nebulizzatore	1 l/min	1,2 l/min
Flusso di campione	0,8 ml/min	1,5 ml/min
Nebulizzatore	Meinhard	Cross flow
Risoluzione	Normale	-
Numero di replicati	3	3
Tempo di lavaggio	40 s	40 s
Calibrazione	esterna	esterna
Curva	lineare	lineare

**Tab. 9. Parametri strumentali per analisi mediante AAS con generazione di idruri e vapori freddi (HG-AAS e CV-AAS)**

Volume campione	200-500 µl
Linearità	100 µg/l
Carrier	HCl 10% v/v
Soluzione riducente	NaBH <sub>4</sub> 0,2% in NaOH 0,05 % v/v1
Flusso di Ar	1 l/min
Numero di replicati	3

**Tab. 10. Parametri strumentali per analisi mediante AAS con fornello di grafite (GF-AAS)**

Modo di atomizzazione	Piattaforma - grafite
Volume campione	20 µl
Modificatore	20 µg di Ni come Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 g/l
Fenditura	0,2 nm
Correzione del fondo	Zeeman
Numero di replicati	3
Temperatura di essiccazione	di 100 °C 1400 °C
Temperatura di incenerimento	di 2500 °C 2600 °C
Temperatura di atomizzazione	di
Temperatura di pulizia	

L'utilizzo dei "bianchi", costituiti dalla sola miscela acida, è fondamentale per il controllo dell'eventuale inquinamento che subiscono i campioni durante le attività di mineralizzazione e per la sottrazione degli apporti di elementi dovuti ai reagenti. In particolare, possono sorgere problemi di "bianchi" ad elevato contenuto di Al a causa della sua notevole diffusione anche negli ambienti chiusi; in questi casi non è ammissibile che si proceda alla correzione dei valori di concentrazione, ottenuti dai campioni, mediante la sottrazione di valori elevati dei "bianchi". Al fine di evitare questa situazione, è opportuno procedere alla valutazione preventiva del livello di "bianco" prima dell'analisi dei campioni, effettuando un ciclo di mineralizzazione con campioni "bianchi" e campioni di controllo a contenuto certificato (BCR 482). Occorre, comunque, processare campioni "bianchi", anche durante i cicli di mineralizzazione dei campioni.

La determinazione del mercurio può essere effettuata anche direttamente sul campione solido, dopo macinazione, mediante analizzatore automatico, secondo i principi generali riportati nel metodo [EPA 7473](#) (Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry). In pratica, il campione viene decomposto in atmosfera di ossigeno per liberare tutti i composti di mercurio. Il campione segue un ciclo automatico di: essiccazione, decomposizione, trasformazione catalitica in mercurio elementare, amalgamazione, misura per assorbimento UV. Con questa tecnica, partendo da circa 100 mg di campione, si può ottenere un limite di rilevabilità di 0,1 ng/g, invece di circa 1 ng/g ottenibile dopo digestione acida con la tecnica automatica oppure con AAS con generazione di vapori freddi. Il vantaggio della tecnica di analisi diretta sul campione solido, oltre al limite di rilevabilità più basso, è anche il ridotto rischio di contaminazione, poiché la preparazione del campione è più semplice.

I risultati sono espressi in mg/kg di peso secco, riferendosi al campione essiccato a 40°C.

### **Garanzia di qualità**

La garanzia di qualità dei laboratori di analisi ha come riferimento la norma UNI

CEI EN ISO/IEC 17025, che fornisce i criteri da adottare per la corretta gestione dei laboratori e delle prove. Inoltre, la precisione e l'accuratezza vengono normalmente controllate effettuando l'analisi del materiale a contenuto certificato.

Queste pratiche, però, non sono spesso sufficienti a garantire la confrontabilità dei risultati (ripetibilità e riproducibilità), come evidenziano le esperienze di intercalibrazione tra laboratori analitici. In campo analitico, una migliore garanzia di qualità può derivare anche dalla creazione di un circuito permanente di intercalibrazione tra laboratori che intendono operare in questo campo specifico. Risulta, quindi, importante che venga istituito un circuito di intercalibrazione nazionale, che faccia riferimento alle norme ISO/IEC 43-1:1997 e 43-2:1997 ed alle linee guida ILAC G13:2000, tra i laboratori di analisi che intendono effettuare la determinazione di elementi in traccia nei bioaccumulatori maggiormente utilizzati. L'attività di intercalibrazione nazionale può fornire, inoltre, le informazioni per il miglioramento del metodo analitico proposto.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- Adamo P., Bargagli R., Giordano S., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., Spagnuolo V., Tretiach M. (2008). Natural and pre-treatments induced variability in the chemical composition and morphology of lichens and mosses selected for active monitoring of airborne elements. *Environmental Pollution* 152: 11-19.
- Adamo P., Crisafulli P., Giordano S., Minganti V., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., Tretiach M., Bargagli, R. (2007). Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part II: Trace element content in living and dead biomonitors and comparison with synthetic materials. *Environmental Pollution*, 146: 392-399.
- Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobianchi R., Violante P. (2003). Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution*, 122: 91-103.
- AFNOR (2008). Biosurveillance de l'environnement – Détermination d'un indice biologique de lichens épiphytes (IBLE). NF X43-903.
- Agnan Y., Séjalon-Delmas N., Claustres A., Probst A. (2015). Investigation of spatial and temporal metal atmospheric deposition in France through lichen and moss bioaccumulation over one century. *Science of the Total Environment*, 529: 285-296.
- Agnan Y., Séjalon-Delmas N., Probst A. (2014). Origin and distribution of rare earth elements in various lichen and moss species over the last century in France. *Science of the Total Environment*, 487: 1-12.
- Ahmadjian V., Hale M.E. (eds.) (1974). *The Lichens*. Academic Press, NewYork.
- Amman, K., Herzig, R., Liebendorfer, L. & Urech, M. (1987). Multivariate correlation of deposition data of 8 different air pollutants to lichen data in a small town in Switzerland. In: *Advances in Aerobiology*, Birkhäuser, Basel: 401-406.
- Aničić M., Tasić M., Frontasyeva M.V., Tomašević M., Rajšić S., Mijić Z., Popović A. (2009). Active moss biomonitoring of trace elements with *Sphagnum girgensohnii* moss bags in relation to atmospheric bulk deposition in Belgrade, Serbia. *Environ. Pollut.* 157: 673–679.
- ANPA (2001). I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. ANPA, Serie Manuali e Linee Guida 2/2001, Roma.
- Ares A., Aboal J.R., Carballeira A., Giordano S.P., Adamo P., Fernández J.A. (2012). Moss bag biomonitoring: A methodological review. *Sci. Total Environ.* 432: 143-158.
- Ares A., Fernández J.A., Carballeira A., Aboal J.R. (2014). Towards the methodological optimization of the moss bag technique in terms of contaminants concentrations and replicability value. *Atmos. Environ.* 94: 496-507.
- Arndt U., Nobel W., Schweizer B. (1987). *Bioindikatoren: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Ulmer, Stuttgart, 388 pp.
- Asta J., Erhardt W., Ferretti M., Fornasier F., Kirschbaum U., Nimis P. L., Purvis O.W., Pirintsos S., Scheidegger C., van Haluwyn C. and Wirth V. (2001) - Mapping lichen diversity as an Indicator of environmental quality.- in: Nimis P.L., Scheidegger C. & Wolseley P.A. (eds.): *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 273-279
- Augusto S., Máguas C., Branquinho C. (2013). Guidelines for biomonitoring persistent organic pollutants (POPs), using lichens and aquatic mosses—a review. *Environmental pollution*, 180: 330-338.
- Augusto S., Máguas C., Branquinho, C. (2009). Understanding the performance of different lichen species as biomonitors of atmospheric dioxins and furans: potential for intercalibration. *Ecotoxicology*, 18: 1036-1042.
- Augusto S., Máguas C., Matos J., Pereira M. J., Branquinho C. (2010). Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: a comparison with soil, air and pine needles. *Environmental Pollution* 158: 483-489.
- Augusto S., Máguas C., Matos J., Pereira M.J., Soares A., Branquinho C. (2009). Spatial modeling of PAHs in lichens for fingerprinting of multisource atmospheric pollution. *Environmental science & technology*, 43: 7762-7769.

- Augusto S., Pereira M.J., Máguas C., Branquinho, C. (2013). A step towards the use of biomonitors as estimators of atmospheric PAHs for regulatory purposes. *Chemosphere*, 92:626-632.
- Augusto S., Pereira M.J., Soares A., Branquinho C. (2007). The contribution of environmental biomonitoring with lichens to assess human exposure to dioxins. *International journal of hygiene and environmental health*, 210: 433-438.
- Augusto S., Pinho P., Branquinho C., Pereira M.J., Soares A., Catarino F. (2004). Atmospheric dioxin and furan deposition in relation to land-use and other pollutants: a survey with lichens. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49: 53-65.
- Ayrault S., Clochiatti R., Carrot F., Daudin L., Bennett J.P. (2007). Factors to consider for trace element deposition biomonitoring surveys with lichen transplants. *Science of the Total Environment*, 372: 717-727.
- Bacci E., Calamari D., Gaggi C., Fanelli R., Focardi S., Morosini M. (1986). Chlorinated hydrocarbons in lichen and moss samples from the Antarctic Peninsula. *Chemosphere*, 15: 747-754.
- Bačkor M., Loppi, S. (2009). Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum*, 53: 214-222.
- Badin G., Nimis P.L. (1996). Biodiversity of epiphytic lichens and air quality in the province of Gorizia (NE Italy). *Studia Geobot.*, 15: 73-89.
- Baffi C., Bettinelli M., Beone G.M., Spezia S. (2002). Comparison of different analytical procedures in the determination of trace elements in lichens. *Chemosphere*, 48: 299-306.
- Bajpai R., Karakoti N., Ureti D.K. (2013a) Performance of a naturally growing Parmelioid lichen *Remototrachyna awasthii* against organic and inorganic pollutants, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20:5577–5592.
- Bajpai R., Shukla V. and Upreti D.K. (2013b) Impact assessment of anthropogenic activities on air quality, using lichen *Remototrachyna awasthii* as biomonitor, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10:1287–1294.
- Balaguer L., Manrique, E. (1991). Interaction between sulfur dioxide and nitrate in some lichens. *Environmental and experimental botany*, 31:223-227.
- Bargagli R. (1988). Determination of metal deposition patterns by epiphytic lichens. - *J. Toxicol. and Environm. Chem.*, 18: 249- 256.
- Bargagli R. (1995) The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. *Sci. Total Environ.*, 176: 121-128.
- Bargagli R. (1998) Trace Elements in Terrestrial Plants. An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. - Springer, Berlin, 324 pp.
- Bargagli R. (1999) The elemental composition of vegetation and the possible incidence of soil contamination of samples. *Science of the Total Environment* 176:121-128.
- Bargagli R., Mikhailova I. (2002). Accumulation of inorganic contaminants. In: P.L. Nimis, C. Scheidegger, P.A. Wolseley (eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam: 65-84.
- Bargagli R., Monaci F., Borghini F., Bravi F., Agnorelli C. (2002). Mosses and lichens as biomonitors of trace metals. A comparison study on *Hypnum cupressiforme* and *Parmelia caperata* in a former mining district in Italy. *Environmental pollution*, 116:279-287.
- Bari A., Rosso A., Minciardi M.R., Troiani F., Piervittori R. (2001). Analysis of heavy metals in atmospheric particulates in relation to their bioaccumulation in explanted *Pseudevernia furfuracea* thalli. *Environmental Monitoring and Assessment* 69: 205-220.
- Basile A., Sorbo S., Aprile G., Conte B., Cobianchi R.C. (2008). Comparison of the heavy metal bioaccumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. *Environmental pollution* 151: 401-407.
- Bauer H., Schönherr J. (1992). Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes. *Pesticide Science*, 35(1): 1-11.
- Baur P., Buchholz A., Schönherr J. (1997). Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. *Plant, Cell & Environment*, 20(8): 982-994.



- Bennett J.P., Dibben M.J., Lyman K.J. (1996). Element concentrations in the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. after 3 years of transplanting along Lake Michigan. *Environmental and Experimental Botany*, 36: 255-270.
- Berg T., Røyset O., Steinnes E. (1995). Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: estimation of uptake efficiencies. *Atmospheric Environment*, 29: 353-360.
- Berg T., Steinnes E. (1997). Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition: from relative to absolute deposition values. *Environmental Pollution*, 98(1): 61-71.
- Bergamaschi L., Rizzio E., Giavari G., Profumo A., Loppi S., Gallorini M. (2004). Determination of baseline element composition of lichens using samples from high elevations. *Chemosphere* 55: 933-939.
- Bergamaschi L., Rizzio E., Valcuvia M.G., Verza G., Profumo A., Gallorini M. (2002). Determination of trace elements and evaluation of their enrichment factors in Himalayan lichens. *Environmental pollution*, 120: 137-144.
- Bettinelli M., Perotti M., Spezia S., Baffi C., Beone G.M., Alberici F., Bergonzi S., Bettinelli C., Cantarini P., Mascetti L. (2002). The role of analytical methods for the determination of trace elements in environmental biomonitors. *Microchemical Journal*, 73: 131-152.
- Blasco M., Domeño C., Nerín C. (2008). Lichens biomonitoring as feasible methodology to assess air pollution in natural ecosystems: Combined study of quantitative PAHs analyses and lichen biodiversity in the Pyrenees Mountains. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(3): 759-771.
- Blasco M., Domeño C., Bentayeb K., Nerín C. (2007). Solid-phase extraction clean-up procedure for the analysis of PAHs in lichens. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 87(12): 833-846.
- Blasco M., Domeño C., López P., Nerín C. (2011). Behaviour of different lichen species as biomonitors of air pollution by PAHs in natural ecosystems. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(9): 2588-2596.
- Blasco M., Domeño C., Nerín C. (2006). Use of lichens as pollution biomonitors in remote areas: comparison of PAHs extracted from lichens and atmospheric particles sampled in and around the Somport tunnel (Pyrenees). *Environmental science & technology*, 40(20): 6384-6391.
- Boamponsem L.K., Adam J.I., Dampare S.B., Nyarko B.J.B., Essumang D.K. (2010). Assessment of atmospheric heavy metal deposition in the Tarkwa gold mining area of Ghana using epiphytic lichens. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(9): 1492-1501.
- Boltersdorf S.H., Pesch R., Werner W. (2014). Comparative use of lichens, mosses and tree bark to evaluate nitrogen deposition in Germany. *Environmental Pollution*, 189: 43-53.
- Branquinho, C., Catarino, F., Brown, D. H., Pereira, M. J., & Soares, A. (1999). Improving the use of lichens as biomonitors of atmospheric metal pollution. *Science of the Total Environment*, 232(1): 67-77.
- Branquinho C. (2001). Lichens. In: M.N.V. Prasad (Ed.), *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*, Marcel Dekker, New York: 117-158.
- Brown D.H. (1987). The location of mineral elements in lichens; implication for metabolism. In: E. Peveling (ed.), *Progress and problems in Lichenology in the Eighties*, *Bibliotheca Lichenologica* 25: 361-375.
- Brunialti G., Frati L. (2014). Bioaccumulation with lichens: the Italian experience. *International Journal of Environmental Studies*, 71:15-26.
- Buonocore M., Annicchiarico C., Cardellicchio N., Di Leo A., Giandomenico S., Spada L. (2013). Contribution to the knowledge of air quality in a highly industrialized site (Taranto city, Italy), by biomonitoring techniques. Extended abstract, *Environmental Engineering and Management Journal*, 12(S11): 245-248.
- Cabrerizo A., Dachs J., Barceló D. and Jones K.C. (2012) Influence of organic matter content and human activities on the occurrence of organic pollutants in antarctic soils, lichens, grass, and mosses, *Environ. Sci. Technol.* 46: 1396-1405.

- Capozzi F., Giordano S., Di Palma A., Spagnuolo V., De Nicola F., Adamo P. (2016). Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. *Chemosphere*, in press.
- Castello M. (1996). Monitoring of airborne metal pollution by moss bags: a methodological study. *Stud. Geobot.* 15: 91-103.
- Castello M., Cenci R.M., Gerdol R. (1998). Proposte metodologiche per l'uso di briofite come bioaccumulatori di metalli in traccia. Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". Roma, 26-27 novembre 1998: 233-241.
- CEN (2014a). Ambient air - Biomonitoring with lichens - Assessing epiphytic lichen diversity. Comité Européen de Normalisation, Technical Standard EN 16413.
- CEN (2014b). Ambient air - Biomonitoring with mosses - Accumulation of atmospheric contaminants in mosses collected in situ: from the collection to the preparation of samples. Comité Européen de Normalisation, Technical Standard EN 16414.
- Cislaghi C., Nimis P.L., (1997). Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature*, 387: 463-464.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89(4): 137-146.
- Cohen J. B., Ruston A. G. (1912). *Smoke a study of town air*. E. Arnold, London, 88 p.
- Colabuono F.I., Taniguchi S., Cipro C.V.Z., da Silva J., Bicego M.C., Montone R.C. (2015). Persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses after fire at the Brazilian Antarctic Station. *Marine pollution bulletin*, 93(1): 266-269.
- Conti M.E., Tudino M., Stripeikis J., Cecchetti G. (2004). Heavy metal accumulation in the lichen *Evernia prunastri* transplanted at urban, rural and industrial sites in Central Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49: 83-94.
- Crowther C., Ruston A.G. (1911). The Nature, Distribution and Effects upon Vegetation of Atmospheric Impurities in and near an Industrial Town. *The Journal of Agricultural Science*, 4: 25-55.
- De Bruin M. (1990). Applying biological monitors and neutron activation analysis in studies of heavy-metal air pollution. *IAEA Bulletin*, 32(4): 22-27.
- de Nicola F., Spagnuolo V., Baldantoni D., Sessa L., Alfani A., Bargagli R., Monaci F., Terracciano S., Giordano, S. (2013). Improved biomonitoring of airborne contaminants by combined use of holm oak leaves and epiphytic moss. *Chemosphere*, 92(9): 1224-1230.
- De Wit T. (1976). Epiphytic lichens and air pollution in The Netherlands. *Bibliotheca Lichenologica* 5: 1-227.
- Demiray A.D., Yolcubal I., Akyol N.H., Çobanoğlu G. (2012). Biomonitoring of airborne metals using the Lichen *Xanthoria parietina* in Kocaeli Province, Turkey. *Ecological Indicators*, 18: 632-643.
- Denys S., Gombert D., Tack K. (2012). Combined approaches to determine the impact of wood fire on PCDD/F and PCB contamination of the environment: A case study. *Chemosphere*, 88(7): 806-812.
- Domeño C., Blasco M., Sánchez C., Nerín C. (2006). A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica chimica acta*, 569(1): 103-112.
- Dongarra G., Varrica, D. (1998). The presence of heavy metals in air particulate at Vulcano island (Italy). *Science of the total environment*, 212(1): 1-9.
- Doucet F.J., Carignan J. (2001). Atmospheric Pb isotopic composition and trace metal concentration as revealed by epiphytic lichens: an investigation related to two altitudinal sections in Eastern France. *Atmospheric Environment*, 35(21): 3681-3690.
- Ellermann T., Nøjgaard J.K., Nordstrøm C., Brandt J., Christensen J., Ketzel M., Jensen S.S. (2012) Annual Summary for 2011. *The Danish Air Quality Monitoring Programme*, 37: 1-66.
- Ellis C.J., Coppins B.J., Dawson T.P., Seaward M.R.D. (2007). Response of British lichens to climate change scenarios: trends and uncertainties in the projected impact for contrasting biogeographic groups. *Biological Conservation*, 140: 217-235.
- EPA, 1996. Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Rev. 0
- EPA, 1998. Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry.

- Fabure J., Meyer C., Denayer F., Gaudry A., Gilbert D., Bernard N. (2010). Accumulation capacities of particulate matter in an acrocarpous and a pleurocarpous moss exposed at three differently polluted sites (industrial, urban and rural). *Water, Air, & Soil Pollution* 212: 205–217.
- Favero-Longo S., Gazzano C., Girlanda M., Castelli D., Tretiach M., Baiocchi C., Piervittori R. (2011). Physical and chemical deterioration of silicate and carbonate rocks by microcolonial fungi and endolithic lichens (Chaetothyriomycetidae). *Geomicrobiology Journal* 28: 732-744.
- Fernández J.A., Aboal J.R., Real C., Carballeira A. (2007). A new biomonitoring method for detecting sources of small scale pollution. *Atmos. Environ.* 41: 2098-2110.
- Fernández R., Galarraga F., Benzo Z., Márquez G., Fernández A.J., Requiz M.G., Hernández J. (2011). Lichens as biomonitors for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Caracas Valley, Venezuela. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 91(3): 230-240.
- Ferry B.W., Baddeley M.S., Hawksworth D.L. (eds.) (1973). *Lichens and Air Pollution*. University of Toronto Press, Toronto, 390 pp.
- Forbes P.B., Thanjekwayo M., Okonkwo J.O., Sekhula M., Zvinowanda C. (2009). Lichens as biomonitors for manganese and lead in Pretoria, South Africa. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(5): 609-614.
- Frati L., Brunialti G., Loppi S. (2005). Problems related to lichen transplants to monitor trace element deposition in repeated surveys: a case study from central Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 52: 221-230.
- Frati L., Santoni S., Nicolardi V., Gaggi C., Brunialti G., Guttova A., Gaudino S., Pati A., Pirintsos S.A., Loppi, S. (2007). Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. *Environmental Pollution*, 146: 311-316.
- Gailey F.A.Y., Lloyd O.L. (1986). Methodological investigations into low technology monitoring of atmospheric metal pollution. Part III: the degree of replicability of the metal concentrations. *Environ. Pollut. Ser. B: Chem. Phys.* 12: 85–109.
- Galun, M. (ed.) (1988). *CRC Handbook of Lichenology*. 3 voll. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Garrec J.-P., Van Haluwyn C. (2002). *Biosurveillance végétale de la qualité de l'air: concepts, méthodes et applications*. Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 117 pp.
- Garty J. (1993). Lichens as biomonitors for heavy metal pollution. In: B. Marken (Ed.), *Plants as Biomonitors: Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH, New York: 193-257.
- Garty J. (2000). Environment and elemental content of lichens. In: B. Markert, K. Friese (eds.), *Trace element – Their distribution and effects in the environment*, Elsevier, Amsterdam: 245-276.
- Garty J. (2000). Trace metals, other chemical elements and lichen physiology: research in the nineties. *Trace Metals in the Environment*, 4: 277-322.
- Garty J. (2001). Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Critical reviews in plant sciences*, 20: 309-371.
- Garty J., A.S. Perry, J. Mozel, Nord. *J. Bot.* 2 (1983) 583-586.
- Garty J., Ammann K. (1987). The amounts of Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Fe, and Mn in some lichens growing in Switzerland. *Environmental Experimental Botany* 27: 127-138.
- Garty J., Tamir O., Levin T., Lehr H. (2007). The impact of UV-B and sulphur-or copper-containing solutions in acidic conditions on chlorophyll fluorescence in selected Ramalina species. *Environmental Pollution*, 145:266-273.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi, S. (2002). Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment*, 36(25): 4069-4075.
- Giordani P. (2006). Variables influencing the distribution of epiphytic lichens in heterogeneous areas: A case study for Liguria, NW Italy. *Journal of Vegetation Science*, 17:195-206.
- Giordani P. (2007). Is the diversity of epiphytic lichens a reliable indicator of air pollution? A case study from Italy. *Environmental Pollution*, 146: 317-323.
- Giordani P., Brunialti G. (2002). Anatomical and histochemical differentiation in lobes of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Mycological Progress* 1:131-136.

- Giordani P., Brunialti G., Alleleo D. (2002). Effects of atmospheric pollution on Lichen Biodiversity (LB) in a Mediterranean region (Liguria, NW-Italy). *Environmental Pollution* 118:53–64.
- Giordani P., Brunialti G., Bacaro G., Nascimbene J. (2012). Functional traits of epiphytic lichens as potential indicators of environmental conditions in forest ecosystems. *Ecological Indicators*, 18: 413-420.
- Giordani P., Modenesi P., Tretiach M. (2003). Determinant factors of calcium oxalate minerals formation, weddellite and whewellite, on the surface of foliose lichens. *Lichenologist*, 35: 255-270.
- Giordano S., Adamo P., Spagnuolo V., Tretiach M., Bargagli R. (2013). Towards a harmonization of the moss-bag monitoring technique: further tests on the accumulation of airborne trace elements in mosses, lichens and synthetic materials. *Chemosphere* 90: 292-299.
- Giordano S., Adamo P., Monaci F., Pittao E., Tretiach M., Bargagli R. (2009). Bags with oven-dried moss for the active monitoring of airborne trace elements in urban areas. *Environ. Pollut.* 157: 2798-2805.
- Godinho R.M., Wolterbeek H.T., Verburg T., Freitas M.C. (2008). Bioaccumulation behaviour of transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata* in relation to total deposition at a polluted location in Portugal. *Environmental Pollution*, 151:318-325.
- Gombert S., Asta J., Seaward M.R.D. (2003). Correlation between the nitrogen concentration of two epiphytic lichens and the traffic density in an urban area. *Environmental Pollution*, 123(2): 281-290.
- González-Miqueo L., Elustondo D., Lasheras E., Santamaria, J.M. (2010). Use of native mosses as biomonitors of heavy metals and nitrogen deposition in the surroundings of two steel works. *Chemosphere*, 78(8): 965-971.
- Goodman G.T., Roberts T. M. (1971). Plants and soils as indicators of metals in the air. *Nature*, 231:287-292.
- Guidotti M., Stella D., Dominici C., Blasi G., Owczarek M., Vitali M., Protano C. (2009). Monitoring of traffic-related pollution in a province of central Italy with transplanted lichen *Pseudovernia furfuracea*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83(6): 852-858.
- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simone C. (2003). Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography A*, 985(1): 185-190.
- Hanson W.C. (1967). Cesium-137 in Alaskan lichens, caribou and eskimos. *Health Physics*, 13(4), 383-389.
- Hanssen J.E., Rambaek J.P., Semb E., Steinnes E. (1980). Ecological impact of acid deposition in Norway. In: *Proceedings of International Conference, Sandefjord, Norway, Oslo*: 116-117.
- Harmens H., Norris D.A., Steinnes E., Kubin E., Piispanen J., Alber R., Aleksiyenak Y., Blum O., Coşkun M., Dam M., De Temmerman L., Fernández J.A., Frolova M., Frontasyeva M., González-Miqueo L., Grodzińska K., Jeran Z., Korzekwa S., Krmar M., Kvietskus K., Leblond S. et al. (2010). Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: Spatial patterns and temporal trends in Europe. *Environmental Pollution*, 158: 3144-3156.
- Hauk M., Mulack C., Paul A. (2002). Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environmental and Experimental Botany*, 48(2): 107-117.
- Hawksworth D. L. (1988). The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96(1): 3-20.
- Hawksworth D.L. Rose L. (1970). Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, 227: 145-148.
- Hawksworth D.L. (1971). Lichens as litmus for air pollution: a historical review. *International Journal of Environmental Studies*, 1: 281-296.
- Herzig R., Urech M. (1991). Flechten als Bioindikatoren - Integriertes biologisches Messsystem der Luftverschmutzung für das Schweizer Mittelland. *Bibl. Lichenol.*, 43, 283 pp.
- Hill D.J. (1974). Some effects of sulphite on photosynthesis in lichens. *New Phytologist*, 73(6): 1193-1205.
- Hutchinson J., D. Maynard. L. Geiser, *USFS-Air Quality and Lichens, a Literature Review*, 1996. <http://gis.nacse.org/lichenaidindex.php?page=literature>, 1996. (consultato il 01.12.15).

- ILAC G13:2000 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.
- Insarov, G.E., Semenov, S.M. & Insarova, I.D. (1999). A system to monitor climate change with epilithic lichens. - *Environmental Monitoring and Assessment*, 55: 279-298.
- ISO/IEC GUIDE 43-1:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 1. Development and operation of proficiency testing schemes.
- ISO/IEC GUIDE 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 2. Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
- Jensen S., Use of Moss And/or Lichen to Monitor Airborne Organic Pollutants (In Swedish): Report to the Swedish Environmental Protection Agency. Stockholm, Sweden, 1990.
- Jeran Z., R. Jaćimović, B. Smodiš, F. Batič, Epiphytic lichens as quantitative biomonitors for atmospheric element deposition, in: IAEA TECDOC-1152, *Biomonitoring of Atmospheric Pollution (With Emphasis on Trace Elements)—BioMAP*, Lisbon. 21-24 September 1997, IAEA, Vienna, 2000, pp. 22-28.
- Jeran Z., Jaćimović R., Batič F., Smodiš B., Wolterbeek, H. T. (1996). Atmospheric heavy metal pollution in Slovenia derived from results for epiphytic lichens. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 354(5-6), 681-687.
- Jeran Z., Mrak T., Jaćimović R., Batič F., Kastelec D., Mavsar R., Simončič, P. (2007). Epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric pollution in Slovenian forests. *Environmental Pollution*, 146(2): 324-331.
- Jovan S., McCune B. (2006). Using epiphytic macrolichen communities for biomonitoring ammonia in forests of the greater Sierra Nevada, California. *Water, Air, & Soil Pollution*, 170: 69-93.
- Jovan S., Carlberg, T. (2007). Nitrogen content of *Letharia vulpina* tissue from forests of the Sierra Nevada, California: geographic patterns and relationships to ammonia estimates and climate. *Environmental monitoring and assessment*, 129: 243-251.
- Jóźwiak M.A. (2012) Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. thalli and changes to morphological structure, *Ecol. Chem. Eng. S* 19: 549-569.
- Kandler O., Poelt J. (1984).Wiederbesiedlung der Innenstadt von München durch Flechten. *Naturwiss. Rundschau*, 37: 90-95.
- Kansanen P.H., Venetvaara J. (1991). Comparison of biological collectors of airborne heavy metals near ferrochrome and steel works. *Water, Air, & Soil Pollution*, 60: 337-359.
- Klumpp A., Ansel W., Klumpp G. (2004). *Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*. Cuvillier, Göttingen, 392 pp.
- Kodnik D., Carniel F.C., Licen S., Tolloi A., Barbieri P., Tretiach M. (2015). Seasonal variations of PAHs content and distribution patterns in a mixed land use area: A case study in NE Italy with the transplanted lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Atmospheric Environment*, 113: 255-263.
- Kunert M., Friese K., Weckert V., Markert B. (1999). Lead isotope systematics in *Polytrichum formosum*: an example from a biomonitoring field study with mosses. *Environmental Science & Technology*, 33(20): 3502-3505.
- Kylin H., Bouwman H. (2012). Hydration State of the Moss *Hylocomium splendens* and the Lichen *Cladina stellaris* Governs Uptake and Revolatilization of Airborne  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane. *Environmental Science & Technology*, 46(20): 10982-10989.
- Langmann U., Madl P., Türk R., Hofmann W., Brunauer G. (2014). Sensitivity of lichens to diesel exhaust under laboratory conditions. *Journal of Environmental Protection*, 5(13): 1331-1341.
- LeBlanc S.F., De Sloover J. (1970). Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Canadian Journal of Botany*, 48:1485-1496.
- Lieboldörfer L., Herzig R., Urech M., K. Ammann (1988). Evaluation und Kalibrierung der Schweizer Flechten. Indikationsmethode mit wichtigen Luftschadstoffen. *Staub, Reinhaltung der Luft* 48: 233-238.
- Lippo H., Poikolainen J., Kubin E. (1995). The use of moss, lichen and pine bark in the nationwide monitoring of atmospheric heavy metal deposition in Finland. *Water, Air, & Soil Pollution*, 85(4): 2241-2246.

- Liu X., Zhang G., Jones K.C., Li X., Peng X., Qi S. (2005). Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum plumaeformae* Wils.) from the northern slope of Nanling Mountains, South China. *Atmospheric Environment*, 39(30): 5490-5499.
- Loppi S. (2014). Lichens as sentinels for air pollution at remote alpine areas (Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 21:2563-2571.
- Loppi S., Frati L., Paoli L., Bigagli V., Rossetti C., Bruscoli C., Corsini A. (2004). Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of the Total Environment*, 326(1): 113-122.
- Loppi S., Riccobono F., Zhang Z.H., Savic S., Ivanov D., Pirintsos S.A. (2003). Lichens as biomonitors of uranium in the Balkan area. *Environmental Pollution*, 125(2), 277-280.
- Loppi S., Pirintsos S.A. (2003). Epiphytic lichens as sentinels for heavy metal pollution at forest ecosystems (central Italy). *Environmental Pollution*, 121(3): 327-332.
- MacIntire, W.H., Hardin L.J., Hester W. (1952). Measurement of Atmospheric Fluorine. Analyses of Rain Waters and Spanish Moss Exposures. *Industrial & Engineering Chemistry*, 44(6): 1365-1370.
- McCune B., Mefford M.J. (2004). *Nonparametric Multiplicative Habitat Modelling*. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon.
- McCune, B. (2000). Lichen communities as indicators of forest health. *Bryologist*, 103: 353-356.
- Mendil D., Çelik F., Tuzen M., Soylak M. (2009). Assessment of trace metal levels in some moss and lichen samples collected from near the motorway in Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2): 1344-1350.
- Migaszewski Z.M., Gałuszka A., Paślawski P. (2002). Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains, South-Central Poland. *Environment International*, 28(4): 303-313.
- Mikhailova I. (2002). Transplanted lichens for bioaccumulation studies. In: P.L. Nimis, C. Schidegger, P.A. Wolseley (eds.) *Monitoring with lichens—Monitoring lichens* (pp. 301-304). Springer Netherlands.
- Minganti V., Capelli R., Drava G., De Pellegrini R., Brunialti G., Giordani P., Modenesi P. (2003). Biomonitoring of trace metals by different species of lichens (*Parmelia*) in North-West Italy, *Journal of Atmospheric Chemistry*, 45:219-229.
- Munzi S., Ravera S., Caneva G. (2007). Epiphytic lichens as indicators of environmental quality in Rome. *Environmental Pollution*, 146:350-358.
- Namieśnik J., Wardencki W. (2002). Monitoring and analytics of atmospheric air pollution. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11(3): 211-218.
- Nascimbene J., Marini L., Nimis, P.L. (2010). Epiphytic lichen diversity in old-growth and managed *Picea abies* stands in Alpine spruce forests. *Forest Ecology and Management*, 260: 603-609.
- Nascimbene J., Tretiach M., Corana F., Lo Schiavo F., Kodnik D., Dainese M., Mannucci B. (2014). Patterns of traffic polycyclic aromatic hydrocarbons pollution in mountain areas can be revealed by lichen biomonitoring: a case study in the Dolomites (Eastern Italian Alps). *Science of the Total Environment* 475: 90-96.
- Nash III T.H. (ed.) (1996). *Lichen biology*. Cambridge, University Press.
- Nash III T.H., Wirth V. (1988) *Lichens, Bryophytes and Air Quality*. Cramer, Berlin, 297 pp.
- Nash III T.H. (2008). Lichen sensitivity to air pollution. In: T.H. Nash III (Ed.), *Lichen Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 301–316.
- Nash III, T. H. (1971). Lichen sensitivity to hydrogen fluoride. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 103-106.
- Nieboer E., Lavoie P., Sasseville R.L.P., Puckett K.J., Richardson D.H.S. (1976). Cation-exchange equilibrium and mass balance in the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*. *Canadian Journal of Botany*, 54(8): 720-723.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. (1980). The replacement of nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution* 1: 3-26.
- Nimis P.L. (1999b) Forum-discussion: the future of Bioindication by lichens. *International Lichenological Newsletter* 32: 1.

- Nimis P.L. (1990). Air Quality Indicators and Indices. The use of plants as bioindicators and biomonitors of air pollution. In: A.G. Colombo, G. Premazzi (eds.): Proc. Workshop on Indicators and Indices, JRC Ispra. EUR 13060 EN, pp.: 93-126.
- Nimis P.L. (1991). Data Quality in Environmental Sciences and the Biomonitoring of Air Pollution. *Giornale Botanico Italiano* 125:126-135.
- Nimis P.L. (1999a). Linee guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti. In: Piccini C., Salvati S. (Eds.): Atti Workshop Biomonitoraggio Qualità dell'aria sul territorio Nazionale. ANPA, Ser. Atti, 2: 267-277.
- Nimis P.L., Andreussi S., Pittao E. (2001). The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the total environment*, 275: 43-51.
- Nimis P.L., Bargagli R. (1999). Linee-guida per l'utilizzo di licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA - Serie Atti, 2/1999.
- Nimis P.L., Castello M., Perotti M. (1990). Lichens as biomonitors of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). *Lichenologist*, 22: 333-344.
- Nimis P.L., Castello M., Perotti M. (1993). Lichens as bioindicators of heavy metal pollution: a case study at La Spezia (N Italy). In: B. Markert (ed.): Plants as Biomonitors, VCH Publishers, pp. 265-284.
- Nimis P.L., Ciccarelli A., Lazzarin G., Bargagli R., Benedet A., Castello M., Gasparo D., Lausi D., Olivieri S., Tretiach M. (1992). I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico nell' area di Schio-Thiene-Breganze (VI). *Atti Mus. Civ. St. Nat. Verona*, 16 ("1989"): 1-154.
- Nimis P.L., Lazzarin G., Gasparo A.D. (1991). Lichens as bioindicators of air pollution by SO<sub>2</sub> in the Veneto Region (NE Italy). *Studia Geobot.*, 11: 3-76.
- Nimis P.L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N. (2000). Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *Science of the total environment*, 255:97-111.
- Nimis P.L., Martellos S. (2001) Testing the predictivity of ecological indicator values. A comparison of real and "virtual" relevés of lichen vegetation. *Plant Ecology* 157:165-172.
- Nimis P.L., Martellos S. (2002). ITALIC-The information system on Italian lichens. *Bibliotheca Lichenologica*, 82:271-284.
- Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds) (2002). Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens. NATO Science Series, IV. Kluwer, Dordrecht, Vol. 7, 408 pp.
- Nimis P.L., Skert N., Castello M. (1999). Biomonitoraggio di metalli in traccia tramite licheni in aree a rischio nel Friuli-Venezia Giulia. *Studia Geobotanica* 18.
- Nylander M.W. (1866). Les lichens du Jardin du Luxembourg. *Bulletin de la Société botanique de France*, 13(7): 364-371.
- Oksanen I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(4): 723-734.
- Ötvös E., Pázmándi T., Tuba, Z. (2003). First national survey of atmospheric heavy metal deposition in Hungary by the analysis of mosses. *Science of the Total Environment*, 309(1): 151-160.
- Paoli L., Munzi S., Fiorini E., Gaggi C., Loppi, S. (2013). Influence of angular exposure and proximity to vehicular traffic on the diversity of epiphytic lichens and the bioaccumulation of traffic-related elements. *Environmental Science and Pollution Research*, 20:250-259.
- Paul A., Hauck M., Fritz E. (2003). Effects of manganese on the element distribution and on the structure in thalli of the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environmental and Experimental Botany*, 50:113-124.
- Pawlik-Skowrońska B., Bačkor, M. (2011). Zn/Pb-tolerant lichens with higher content of secondary metabolites produce less phytochelatin than specimens living in unpolluted habitats. *Environmental and Experimental Botany*, 72(1): 64-70.
- Pawlik-Skowronska B., Purvis O.W., Pirszel J., Skowronski T. (2006). Cellular mechanisms of Cu-tolerance in the epilithic lichen *Lecanora polytropa* growing at a copper mine. *The Lichenologist*, 38:267-275.
- Pawlik-Skowronska B., Sanità di Toppi L., Favali M.A., Fossati F., Pirszel J., Skowronski T. (2002). Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist*, 156:95-102.

- Pearson L., Skye E. (1965). Air pollution affects pattern of photosynthesis in *Parmelia sulcata*, a corticolous lichen. *Science*, 148(3677): 1600-1602.
- Piccini C., Salvati S. (1999). Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale" Roma, 26-27 novembre 1998.
- Podani J. (2000). Introduction to the exploration of multivariate biological data. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 407 pp.
- Poikolainen J., Kubin E., Piispanen J., Karhu J. (2004). Atmospheric heavy metal deposition in Finland during 1985–2000 using mosses as bioindicators. *Science of the Total Environment*, 318(1): 171-185.
- Protano C., Guidotti M., Owczarek M., Fantozzi L., Blasi G. and Vitali M. (2014) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and metals in transplanted lichen (*Pseudevernia furfuracea*) at sites adjacent to a solid-waste landfill in central Italy, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66:471–481.
- Puckett K.J. (1988). Bryophytes and lichens as monitors of metal deposition. *Bibliotheca Lichenologica*, 30: 231-267.
- Purvis O.W., Chimonides P.D.J., Jeffries T.E., Jones G.C., Rusu A.M., Read H. (2007). Multi-element composition of historical lichen collections and bark samples, indicators of changing atmospheric conditions. *Atmospheric Environment*, 41:72-80.
- Purvis O.W., Elix J.A., Broomhead J.A., Jones G.C. (1987). The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist*, 19:193-203.
- Purvis O.W., Elix J.A., Gaul K.L. (1990). The occurrence of copper-psoromic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist*, 22: 345-354.
- Purvis O.W., Williamson B.J., Bartok K., Zoltani N. (2000). Bioaccumulation of lead by the lichen *Acarospora smaragdula* from smelter emissions. *New Phytologist*, 147:591-599.
- Purvis, W. (2000). Lichens. The Natural History Museum. London.
- Quevauviller P., Herzig R., Muntau H. (1996). Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring. *Science of The Total Environment* 187: 143-152.
- Quevauviller P.H., Van Renterghem D., Muntau H., Griepink B., 1992. Intercomparison to improve the quality of trace element determination in lichens. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 53:233-242.
- Richardson D.H.S., K.J. Puckett, in: B.W. Ferry, M.S. Baddeley, D.L. Hacksworth (Eds.), *Air Pollution and Lichens*, Athlone Press, London, 1973, pp. 283-299.
- Richardson, D.H.S. (1992). Pollution monitoring with lichens. Richmond. Slough, UK
- Rikkinen J. (1997). Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient, *Acta Universitatis Upsaliensis: Symbolae Botanicae Upsaliensis*, 32: 223-245.
- Rogers R.W. (1977). 'City effect' on lichens in the Brisbane area. *Search*: 75-77.
- Romagnoli E. (2007). La procedura di Valutazione di Impatto Ambientale (V.I.A.): evoluzione normativa e procedurale. [http://www.ambientediritto.it/dottrina/Politiche%20energetiche%20ambientali/politiche%20e.a/via\\_romagnoli.htm](http://www.ambientediritto.it/dottrina/Politiche%20energetiche%20ambientali/politiche%20e.a/via_romagnoli.htm)
- Rose C.I., Hawksworth D.L. (1981). Lichen recolonization in London's cleaner air. *Nature*, 289: 289-292.
- Rose CI, Hawksworth DL, 1981. Lichen recolonization in London's cleaner air. *Nature* 289: 289-292.
- Rose, F (1976). Lichenological indicators of age and environmental continuity in woodlands. In: Brown, D.H., Hawksworth, D.L. & Bailey, R.H. (eds.): *Lichenology: Progress and Problems*. Academic Press. London. pp. 279-307.
- Ross H.B. (1990). On the use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for estimating atmospheric trace metal deposition. *Water, Air, & Soil Pollution*, 50: 63-76.
- Rühling A., Tyler G. (1970). Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch. *Oikos*, 21:92-97.
- Salvadori O., Tretiach M. (2002). Thallus-substratum relationships of silicicolous lichens occurring on carbonatic rocks of the Mediterranean region. In: X. Llimona, H.T. Lumbsch, S. Ott (eds.), *Progress and Problems in Lichenology at the Turn of the Millenium – IAL 4*, *Bibliotheca Lichenologica* 82: 57-64.



- Samdudin M.W., Azahar H., Abas A. and Zakaria Z. (2013) Determination of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contents using the lichen *Dirinaria picta* in Universiti Kebangsaan Malaysia, *J. Environ. Prot.* 4:760–765.
- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwin C., Deruelle S., Hazemann J.L., Soldo Y., Eybert-Berard L., Menthonnex J.J. (1998). Mechanism of lichen resistance to metallic pollution. *Environmental Science and Technology*, 32: 3325-3330.
- Satya, Upreti D.K. and Patel D.K. (2012). *Rinodina sophodes* (Ach.) Massal.: a bioaccumulator of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kanpur City, India, *Environ. Monit. Assess.* 184:229–238.
- Sawidis T., Chettri M.K., Zachariadis G.A., Stratis J.A., Seaward M.R.D. (1995). Heavy metal bioaccumulation in lichens from Macedonia in northern Greece. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 50:157-166.
- Sawidis T., Heinrich, G. (1992). Cesium-137 monitoring using lichens and mosses from northern Greece. *Canadian journal of botany*, 70(1), 140-144.
- Schrlau J.E., Geiser L., Hageman K.J., Landers D.H., Simonich S.M. (2011). Comparison of lichen, conifer needles, passive air sampling devices, and snowpack as passive sampling media to measure semi-volatile organic compounds in remote atmospheres. *Environmental Science & Technology*, 45(24): 10354-10361.
- Seaward M.R.D. (1997). Urban deserts bloom: a lichen renaissance. *Bibliotheca Lichenologica* 67:297-309.
- Seaward M.R.D., Letrouit-Galinou M.A. (1991). Lichen recolonization of the trees in the Jardin du Luxembourg, Paris. *Lichenologist*, 23: 181-186.
- Shaw A.J., Goffinet B. (2000). *Bryophyte biology*. Cambridge University Press.
- Shukla V., Patel D.K., Upreti D.K., Yunus M. (2012). Lichens to distinguish urban from industrial PAHs. *Environmental chemistry letters*, 10(2): 159-164.
- Shukla V., Upreti D.K., Patel D.K., Yunus M. (2013). Lichens reveal air PAH fractionation in the Himalaya. *Environmental chemistry letters*, 11(1): 19-23.
- Shukla V., Upreti D.K. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in lichen *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun City, Garhwal Himalayas. *Environmental monitoring and assessment*, 149: 1-7.
- Shukla V., D.K. Upreti, R. Bajpai, *Lichens to Biomonitor the Environment*, Springer, India, 2014.
- Sloof J.E. (1995). Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmospheric Environment*, 29(1): 11-20.
- Sloof J.E., Wolterbeek H.T. (1991). National trace-element air pollution monitoring survey using epiphytic lichens. *Lichenologist*, 23(2): 139-165.
- Smith A.J.E. (Ed.). (2012). *Bryophyte ecology*. Springer Science & Business Media.
- Smith C.W., Aptroot A., Coppins B.J., Fletcher A., Gilbert O.L., James P.W., Wolseley P.A. (2009). *The lichens of Great Britain and Ireland*, British Lichen Society, London, 1046 pp.
- Sorauer P., Ramann E. (1899). Sogenannte unsichtbare Rauchbeschädigungen. *Botanisches Centralblatt* 80: 50-60; 106-116; 156-168; 205-216; 251-262.
- Sorbo S., Aprile G., Strumia S., Cobianchi R.C., Leone A., Basile A. (2008). Trace element accumulation in *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf exposed in Italy's so called Triangle of Death. *Science of the Total Environment*, 407:647-654.
- Spagnuolo V., S. Giordano, A. Perez-Llamazares, A. Ares. A. Carballeira, J.A. Fernandez, J.R. Aboal, *Sci. Total Environ.* 463-464 (2013) 727-733.
- Spagnuolo V., Terracciano S., Giordano S. (2009). Trace element content and molecular biodiversity in the epiphytic moss *Leptodon smithii*: two independent tracers of human disturbance. *Chemosphere*, 74(9): 1158-1164.
- Sparrius L.B., 2007. Response of epiphytic lichen communities to decreasing ammonia air concentrations in a moderately polluted area of The Netherlands. *Environmental Pollution*, 146: 375–379.
- Tretiach M. (2014). *Biomonitoraggio attivo della deposizione di elementi in traccia intorno alla città di Monfalcone mediante licheni*. Relazione tecnica, ined., 33 pp. + schede.

- Tretiach M. (2015). Confronto della capacità di accumulo di due specie di licheni epifiti per la verifica di eventuali scostamenti dai valori di naturalità riconducibili all'attività della centrale termoelettrica a2a di Monfalcone. Relazione tecnica, ined., 30 pp. + figure + tabelle + schede (disponibile sul sito web di ARPA FVG all'indirizzo <http://www.arpa.fvg.it/cms/tema/aria/stato/biomonitoraggio/licheni/Studio-licheni-centrale-a2a.html>).
- Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., Giordano S., Modenesi P., Orlando S., Pittao E. (2007). Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I: Influence of exposure on sample vitality. *Environmental Pollution*, 146:380-391.
- Tretiach M., Baruffo L. (2001). Contenuto di elementi in traccia in talli di *Parmelia borrieri* e *Xanthoria parietina* raccolti sullo stesso forofita. *Notiziario della Società Lichenologica Italiana* 14: 70.
- Tretiach M., Carniel F.C., Loppi S., Carniel A., Bortolussi A., Mazzilis D., Del Bianco C. (2011). Lichen transplants as a suitable tool to identify mercury pollution from waste incinerators: a case study from NE Italy. *Environmental monitoring and assessment*, 175:589-600.
- Tretiach M., Crisafulli P., Pittao E., Rinino S., Roccotiello E. & Modenesi P., 2005. Isidia ontogeny and its effects on the CO<sub>2</sub> gas exchanges of the epiphytic lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. *Lichenologist*, 37: 445-462.
- Tretiach M., Ganis P. (1999). Effects of H<sub>2</sub>S on epiphytic lichen vegetation: a study case from M. Amiata (Central Italy). *Lichenologist*, 31: 163-181.
- True A., Panichev N., Okonkwo J.O., Forbes P.B. (2012). Determination of the mercury content of lichens and comparison to atmospheric mercury levels in the South African Highveld region. *Clean Air Journal*, 21: 19-25.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
- Upreti D.K., Patel D.K. (2012). *Rinodina sophodes* (Ach.) Massal.: a bioaccumulator of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kanpur City, India. *Environmental monitoring and assessment*, 184(1): 229-238.
- Usenko S., Massey Simonich S.L., Hageman K.J., Schrlau J.E., Geiser L., Campbel D.H., Appleby P.G. and Landers D.H. (2010) Sources and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to western U.S. national parks, *Environ. Sci. Technol.* 44:4512–4518.
- Uyar G., Oeren M., Ince M. (2007). Atmospheric heavy metal deposition in Duzce province by using mosses as biomonitors. *Fresenius Environmental Bulletin* 16(2): 145-153.
- Van der Wat L., Forbes P.B. (2015). Lichens as biomonitors for organic air pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 64: 165-172.
- Van Dobben H.F., De Bakker A.J. (1996). Re-mapping epiphytic lichen biodiversity in the Netherlands: effects of decreasing SO<sub>2</sub> and increasing NH<sub>3</sub>. *Acta Botanica Neerlandica*, 45: 55-71.
- Van Dobben H.F., Wolterbeek H.T., Wamelink G.W.W., Ter Braak C.J.F. (2001). Relationships between epiphytic lichens, trace elements and gaseous atmospheric pollution. *Environmental Pollution*, 112: 163-169.
- Van Herk C.M. (1999). Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in the Netherlands. *Lichenologist*, 31: 9-20.
- Varanasi U. (Ed.) (1989). *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- VDI 3957 Part 13 (2005). Biological measurement procedures for determining and evaluating the effects of ambient air pollutants by means of lichens (bioindication) – Mapping the diversity of epiphytic lichens as an indicator of air quality. Berlin: Beuth-Verlag.
- Villeneuve J.P., Holm E. (1984). Atmospheric background of chlorinated hydro-carbons studied in Swedish lichens. *Chemosphere*, 13(10): 1133-1138.
- Vingiani S., Adamo P., Giordano S. (2004). Sulphur, nitrose and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental Pollution* 129: 1145-1158.
- Wegener J.W.M., Van Schaik M.J.M., Aiking H. (1992). Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. *Environmental Pollution*, 76(1): 15-18.

- Wellburn A.R., Higginson C., Robinson D., Walmsley C. (1981). Biochemical explanations of more than additive inhibitory effects of low atmospheric levels of sulfur dioxide plus nitrogen dioxide upon plants. *New Phytologist*, 88: 223-237.
- Wieler A. (1913). Verhandlung Naturwissenschaftshistorischen. Vereins des Preu-sischen Rhein-landes and Westfalen 70: 387-400.
- Will-Wolf S., Makhholm M.M., Nelsen M.P., Trest M.T., Reis A.H., Jovan S. (2015). Element analysis of two common macrolichens supports bioindication of air pollution and lichen response in rural midwestern USA. *The Bryologist*, 118: 371-384.
- Wirth V. (1995). Ermittlung und Beurteilung phytotoxischer Wirkungen von Immissionen mit Flechten. Flechtenkartierung zur Ermittlung des Luftgütewertes (LGW). VDI-Richtlinien 3799 Blatt 1.
- Wirth V. (2010). Ökologische Zeigerwerte von Flechten - erweiterte und aktualisierte Fassung. *Herzogia*, 23: 229-248.

Prof. Mauro Tretiach

Trieste, 05 febbraio 2016