

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale

XXIV° CICLO

Settore Disciplinare BIO/07

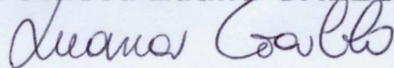
DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA

Tesi di Dottorato

STUDIO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA NELLA ZONA LIMITROFA
AL SITO INDUSTRIALE ITALCEMENTI DI CASTROVILLARI
ATTRAVERSO UNA BATTERIA DI TEST ECOFISIOLOGICI,
QUALI INDICATORI PRECOCI DI STRESS AMBIENTALE,
UTILIZZANDO I LICHENI COME ORGANISMI SENSIBILI

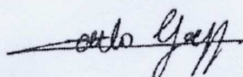
TUTOR

Dott.ssa Luana GALLO

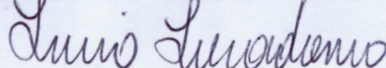


CO-TUTOR

Prof. Carlo GAGGI

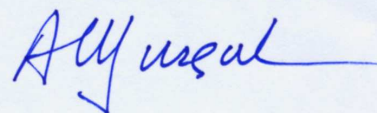


Dott. Lucio LUCADAMO



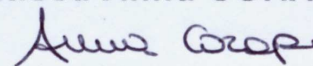
COORDINATORE

Prof. Aldo MUSACCHIO



CANDIDATA

Dott.ssa Anna CORAPI



INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

| | |
|--|--------|
| L'INQUINAMENTO ATMOSFERICO..... | pag. 2 |
| 1.1 L'inquinamento atmosferico..... | “ “ 2 |
| 1.1.1 La contaminazione atmosferica da traffico veicolare..... | “ “ 5 |
| 1.1.2 La contaminazione atmosferica da agricoltura..... | “ “ 7 |
| 1.1.3 La contaminazione atmosferica da attività industriali..... | “ “ 8 |
| 1.1.3.1 L'industria del cemento..... | “ “ 9 |
| 1.2 Meteorologia ed inquinamento atmosferico..... | “ “ 15 |
| 1.3 Il biomonitoraggio..... | “ “ 16 |
| 1.4 I licheni come <i>biomonitors</i> | “ “ 17 |
| 1.5 Bioaccumulo di elementi in traccia nei licheni..... | “ “ 20 |
| 1.6 Il particolato atmosferico..... | “ “ 22 |

CAPITOLO 2

| | |
|--|--------|
| MATERIALI E METODI..... | “ “ 25 |
| 2.1 Area di studio..... | “ “ 25 |
| 2.2 Disegno sperimentale..... | “ “ 27 |
| 2.3 Attività di campo..... | “ “ 31 |
| 2.3.1 Ricerca delle stazioni di campionamento..... | “ “ 31 |
| 2.3.2 Prelievo e trapianto dei talli lichenici..... | “ “ 32 |
| 2.3.3 Posizionamento dei campionatori passivi..... | “ “ 35 |
| 2.3.4 Posizionamento del campionario attivo..... | “ “ 37 |
| 2.4 Attività di laboratorio..... | “ “ 39 |
| 2.4.1 Saggi ecofisiologici sui talli lichenici..... | “ “ 39 |
| 2.4.1.1 Vitalità dei talli lichenici..... | “ “ 39 |
| 2.4.1.2 Danneggiamento delle membrane cellulari dei talli lichenici..... | “ “ 39 |
| 2.4.1.3 Perossidazione dei lipidi di membrana dei talli lichenici..... | “ “ 40 |
| 2.4.1.4 Pigmenti fotosintetici e degradazione della clorofilla..... | “ “ 41 |
| 2.4.1.5 Efficienza fotosintetica..... | “ “ 42 |
| 2.4.2 Analisi dei filtri dei campionatori passivi..... | “ “ 44 |
| 2.4.2.1 Ossidi di azoto..... | “ “ 44 |
| 2.4.2.2 Biossido di zolfo..... | “ “ 45 |
| 2.4.2.3 Ozono..... | “ “ 46 |

| | | |
|---|-----|-----|
| 2.4.2.4 Ammoniaca..... | “ “ | 47 |
| 2.4.3 Determinazione degli elementi in traccia ed ultratraccia..... | “ “ | 47 |
| CAPITOLO 3 | | |
| RISULTATI E DISCUSSIONE..... | “ “ | 49 |
| 3.1 Richieste ecologiche del lichene <i>Pseudevernia furfuracea</i> | “ “ | 49 |
| 3.2 Individuazione dei venti dominanti..... | “ “ | 50 |
| 3.3 Valutazione della variazione delle componenti gassose dell'atmosfera nel periodo di esecuzione del monitoraggio biologico..... | “ “ | 53 |
| 3.3.1 Ammoniaca (NH_3)..... | “ “ | 53 |
| 3.3.2 Ossidi di azoto (NO_x)..... | “ “ | 55 |
| 3.3.3 Ozono (O_3)..... | “ “ | 56 |
| 3.3.4 Anidride solforosa (SO_2)..... | “ “ | 58 |
| 3.4 Premessa all'analisi dei risultati dei trapianti di <i>Pseudevernia furfuracea</i> | “ “ | 59 |
| 3.5 Valutazione del <i>trend temporale</i> dell'accumulo di metalli pesanti e dei parametri ecofisiologici nel lichene <i>Pseudevernia furfuracea</i> durante il periodo di monitoraggio (maggio 2010 - aprile 2011)..... | “ “ | 60 |
| 3.6 Valutazione del <i>trend spaziale</i> dell'accumulo di metalli pesanti e dei parametri ecofisiologici nel lichene <i>Pseudevernia furfuracea</i> durante il periodo di monitoraggio (maggio 2010 - aprile 2011)..... | “ “ | 85 |
| 3.6.1 Primo trapianto lichenico (maggio - luglio 2010)..... | “ “ | 85 |
| 3.6.2 Terzo trapianto lichenico (novembre 2010 - gennaio 2011)..... | “ “ | 93 |
| 3.6.3 Quarto trapianto lichenico (febbraio 2011 - aprile 2011)..... | “ “ | 103 |
| CAPITOLO 4 | | |
| CONCLUSIONI..... | “ “ | 112 |
| BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA | “ “ | 116 |
| ALLEGATO I | | |
| <i>Boxplots relativi alla concentrazione degli elementi in traccia ed ai valori dei parametri ecofisiologici misurati nei talli nei tre trapianti lichenici</i> | | |
| ALLEGATO II | | |
| <i>Carte di isoconcentrazione relative ai metalli bioaccumulati nel terzo trapianto lichenico</i> | | |
| ALLEGATO III | | |
| <i>Carte di isoconcentrazione relative ai parametri ecofisiologici misurati nei talli nei trapianti lichenici</i> | | |

INTRODUZIONE

Il monitoraggio dell'inquinamento atmosferico è una delle attività più complesse nell'ambito della salvaguardia ambientale e della prevenzione dei possibili danni alla salute umana.

Nonostante le limitazioni sempre più severe alle concentrazioni al suolo degli inquinanti, la quantità delle sostanze emesse in atmosfera è, in generale, ancora molto elevata. Conseguentemente, la qualità dell'aria che respiriamo è in certi casi gravemente compromessa.

La presenza in atmosfera di sostanze inquinanti (ossidi di azoto, metalli pesanti, biossido di zolfo, acidi cloridrico e fluoridrico, ozono, monossido di carbonio, composti organici, *etc.*) può raggiungere valori di allarme soprattutto in aree ad elevato impatto antropico (ANPA, 2001).

Pertanto, in tali aree il livello degli inquinanti va monitorato costantemente, tanto più che è ormai scientificamente dimostrato che molti di essi agiscono in maniera additiva e/o sinergica sugli organismi vegetali, animali oltre che sull'uomo.

In tal senso, le tecniche di biomonitoraggio, basate sulla misura degli effetti degli inquinanti su organismi *monitor* quali licheni, muschi, artropodi *etc.*, permettono nel loro complesso di ottenere dati di interesse intrinseco.

Queste tecniche, infatti, non misurano, negli organismi *monitor*, i generici parametri teoricamente correlati con l'inquinamento ambientale, bensì le *deviazioni* di detti organismi da condizioni *normali* di vita, in termini morfologici, citologici, fisiologici ed ecologici.

Tali deviazioni possono risultare assai utili per stimare gli effetti combinati di più inquinanti su tali organismi ed operare, ove necessario e possibile, concreti interventi preventivi e/o di bonifica ambientale.

Il principale obiettivo di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare la qualità dell'aria nella zona limitrofa al sito industriale ITALCEMENTI, utilizzando quale organismo *biomonitor* il lichene *Pseudevernia furfuracea* e valutando nei talli trapiantati *in loco* sia le concentrazioni di elementi in traccia sia i valori assunti da un insieme di parametri ecofisiologici, la cui variazione sia riconducibile alla differente espressione di fattori di stress ambientale.

CAPITOLO 1

L'INQUINAMENTO ATMOSFERICO

1.1 L'inquinamento atmosferico

L'inquinamento atmosferico è un fattore di stress definito dal D.P.R. 24 Maggio 1988 n° 203 come "...ogni modificazione della normale composizione o stato fisico dell'aria atmosferica, dovuta alla presenza nella stessa di una o più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da:

- *alterare le normali condizioni ambientali e di salubrità dell'aria;*
- *costituire un pericolo ovvero un pregiudizio diretto o indiretto per la salute dell'uomo;*
- *compromettere le attività ricreative e gli altri usi legittimi dell'ambiente;*
- *alterare le risorse biologiche, gli ecosistemi ed i beni materiali pubblici e privati."*

Il suddetto decreto definisce inoltre lo standard di qualità, ovvero il limite massimo di accettabilità della concentrazione e, dunque, dell'esposizione (e.g. concentrazione/tempo) per i diversi inquinanti e delle condizioni ambientali; si riferisce però ai soli esseri umani, senza tenere in debita considerazione le altre forme di vita.

Si stima che i contaminanti emessi in aria siano diverse decine di migliaia (comprendendo sia i così detti naturali che gli xenobiotici), di cui i principali, in termini quantitativi, sono: il monossido di carbonio (CO), gli ossidi di azoto (NO_x), gli ossidi di zolfo (SO_x), gli idrocarburi (C_xH_x), l'ozono (O₃) ed il particolato atmosferico (PM, acronimo di *Particulate Matter*).

Quest'ultimo rappresenta l'insieme delle particelle solide o liquide di forma e dimensioni variabili presenti nell'aria ed è normalmente arricchito di una lunga serie di elementi in traccia con tossicità variabile (e.g. As, Cd, Cr, Fe, Mn, Pb, Sb).

I principali fenomeni di origine naturale in grado di immettere in atmosfera contaminanti organici ed inorganici sono principalmente l'attività vulcanica e quella idrotermale, l'attività biologica (e.g. decomposizione della sostanza organica), la sospensione ed il trasporto di polveri di derivazione geogenica (*soil dust* da rocce e suoli) e biogenica (aerosol biogenico), lo spray salino ed il rilascio dagli oceani.

Pur essendo le sorgenti naturali responsabili dell'emissione di rilevanti quantità di inquinanti, di norma esse sono ben distribuite nel tempo e nello spazio, andando ad interessare vaste aree; pertanto, la diluizione che subiscono è tale che raramente costituiscono problemi per l'ambiente e/o a livello locale.

Al contrario, le fonti antropogeniche sono: tutte le attività che comportano combustioni (e.g. impianti di riscaldamento, centrali termoelettriche, motori dei veicoli,

inceneritori di rifiuti solidi urbani), le attività industriali, l'agricoltura e gli impianti zootecnici.

Tra queste la contaminazione e l'inquinamento industriale è probabilmente da indicare al primo posto, non solo per l'aspetto quantitativo, ma anche per i disturbi provocati ai sistemi naturali a causa del carattere di continua presenza. Si tratta di una fonte eterogenea di sostanze che varia in funzione dei diversi processi di lavorazione, delle materie prime e dei catalizzatori impiegati, delle caratteristiche degli impianti di scarico degli effluenti.

Il riscaldamento domestico rappresenta, invece, una sorgente alquanto omogenea di inquinamento, costituita dai derivati della combustione di prodotti solidi (e.g. carbone, legna), liquidi (e.g. gasolio, kerosene) o gassosi (metano ed altri idrocarburi).

Le sostanze che si liberano nel corso delle combustioni di questi composti sono diverse. Nel caso della combustione del carbone sono stati identificati, nelle emissioni, oltre 100 prodotti organici presenti.

Gli inquinanti fitotossici che vengono rilasciati in concentrazioni pericolose non superano la decina e sono prevalentemente inorganici; fra questi, i principali sono l' SO_2 e gli NO_x .

L'inquinamento determinato dagli impianti di riscaldamento ha l'aggravante di coincidere con la stagione più fredda, quando si hanno più frequentemente situazioni meteorologiche sfavorevoli alla dispersione di inquinanti aerodiffusi (e.g. inversione termica, formazione di nebbie).

Anche il traffico veicolare determina gravi fenomeni di inquinamento ambientale, con massima incidenza nelle aree metropolitane; si stima, infatti, che il solo traffico veicolare contribuisca per il 50-60% dell'inquinamento nelle aree urbane (Di Lella *et al.*, 2005) e per circa il 20% all'immissione di CO_2 a livello globale.

L'incidenza relativa delle principali fonti varia da una situazione ad un'altra, in dipendenza, oltre che dal periodo stagionale, anche dalla natura della sorgente, dalle proprietà climatiche e dall'orografia dell'area.

Sulla base delle loro caratteristiche, le fonti possono essere distinte in istantanee e continue e, in relazione alla collocazione geografica in:

- *localizzate* (o *puntiformi* o *puntuali*), ovvero impianti isolati per i quali la diluizione e la dispersione degli effluenti sono tali che gli effetti che provocano sono di norma limitati a un raggio di qualche chilometro, in virtù dell'altezza dei camini e del regime dei venti. Si conoscono, comunque, casi in cui l'impatto diretto di una sorgente di vasta portata, dotata di camini elevati, si è verificato per centinaia di chilometri;

- *lineari*, quali quelle connesse con il traffico veicolare extraurbano. Le conseguenze dirette sono generalmente apprezzabili in una fascia di centinaia di metri dalla sede stradale;
- di *grossa ampiezza* (o *areali* o *diffuse*), costituite da un grande numero di piccole sorgenti distribuite su una vasta zona ed aventi altezze simili tra di loro, come le aree urbane (riscaldamento, traffico) e gli impianti concentrati in comprensori industriali. In questi casi è praticamente impossibile interpretare le conseguenze sull'ambiente delle singole fonti (Lorenzini & Nali, 2005).

Una volta immessi in atmosfera i contaminanti sono trasportati e dispersi dalle correnti d'aria a quote diverse per tempi e distanze variabili, il tutto regolato essenzialmente, da una parte, dalle caratteristiche chimico-fisiche delle specie contaminanti e, dall'altra, dai fenomeni di diffusione turbolenta e di trasporto delle masse d'aria strettamente dipendenti dal comportamento climatico degli strati bassi dell'atmosfera (Lorenzini & Nali, 2005).

Una parte rilevante dei contaminanti atmosferici è depositata entro una distanza dalla sorgente di emissione compresa tra poche decine di metri ed alcuni chilometri.

Il resto del *pool* in aria cade a distanze maggiori, fino a 1000 km, andando incontro ad eventuali trasformazioni chimico - fisiche con formazione di contaminanti secondari.

La caduta al suolo dei contaminanti atmosferici può avvenire sia per via secca (*dry deposition*), meccanismo legato essenzialmente all'azione della gravità ed ai moti delle correnti d'aria in connessione con lineamenti morfologici che possono agire da barriere, che per via umida (*wet deposition*), per l'azione di abbattimento, sia fisica che chimica, esercitata dalle precipitazioni atmosferiche quali pioggia, neve e grandine.

Una caratteristica comune alla quasi totalità degli agenti tossici è la fluttuazione della concentrazione in un determinato sito.

Queste variazioni, provocate da fattori ambientali ed eventualmente anche da oscillazioni della fonte, comportano che le medie cambino in continuazione, con modificazioni anche notevoli in breve tempo, potendosi avere assenza di contaminanti in una stazione relativamente vicina ad un'altra che ne presenta, invece, elevate quantità.

Tali variabili rendono difficile l'avanzare di previsioni circa le condizioni di inquinamento di una zona, anche qualora siano note nel dettaglio le caratteristiche quali - quantitative delle emissioni: si può dire che ogni giorno abbia la propria storia, con differenze anche sensibili tra siti vicini.

Se nel breve periodo i parametri climatici tendono a mutare spesso rispetto alle sorgenti di inquinanti, è tuttavia vero che – considerando lunghi intervalli di tempo – sono le fonti ad essere suscettibili delle più ampie ed imprevedibili variazioni (Lorenzini & Nali, 2005).

Per avere un'idea della contaminazione urbana e periurbana, nel dicembre del 2008 l'EEA^[1] (*European Environment Agency*) ha aggiornato un set di indicatori inerenti la qualità in area urbana e le emissioni in atmosfera.

In particolare gli indicatori relativi alla qualità dell'aria riassumono ed analizzano le informazioni inerenti il non rispetto dei limiti normativi imposti a livello europeo per il particolato (PM₁₀), il biossido di azoto, l'ozono ed il biossido di zolfo.

Secondo l'EEA nel periodo compreso tra il 1997 ed il 2006 una significativa percentuale della popolazione urbana europea è stata potenzialmente esposta a concentrazioni dei suddetti contaminanti superiori rispettivamente:

- PM₁₀: 18-50% della popolazione esposta a concentrazioni superiori a 50 µg/m³ (media su 24 ore) per un periodo superiore a 35 giorni in un anno civile;
- Biossido di azoto: 18-42% della popolazione esposta a concentrazioni superiori ad una media annuale di 40 µg/m³;
- Ozono: 14-61% della popolazione esposta a concentrazioni superiori a 120 µg/m³ (media giornaliera su 8 ore mediata su tre anni) per un periodo superiore a 25 giorni in un anno civile;
- Biossido di zolfo: la percentuale della popolazione urbana esposta decresce fino a raggiungere valori molto vicini all'1% e la tendenza è al rispetto del limite di 125 µg/m³ per meno di 3 giorni all'anno (D.M. n° 60 del 2/04/2002).

Non esistono dati così puntuali, a livello Comunitario, relativamente ad altri contaminanti (e.g. elementi in traccia/ultratraccia) ma, essendo molti di essi associati ai PM₁₀, è molto probabile un livello nelle aree urbane sicuramente non in diminuzione.

Per quanto sopra detto risulta evidente come le azioni di mitigazione non siano efficienti e/o sufficienti nonostante il continuo monitoraggio da parte di Enti (per l'Italia Agenzie Regionali per l'Ambiente) addette al controllo della qualità dell'aria.

1.1.1 La contaminazione atmosferica da traffico veicolare

Nelle aree urbane il traffico veicolare rappresenta, in genere, la principale fonte di contaminanti atmosferici, essenzialmente associati agli scarichi dei veicoli a motore sotto forma di gas e particelle incombuste, nonché prodotti dall'usura delle loro

principali componenti (e.g. pneumatici, freni, frizioni e carrozzeria) e dall'abrasione del manto stradale.

Questi contaminanti sono rappresentati essenzialmente dal particolato atmosferico, dagli ossidi di zolfo e di azoto, dal monossido di carbonio, dagli idrocarburi aromatici (principalmente benzene), dagli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), dall'ozono oltre che dalle dibenzodiossine policlorurate (PCDDs) e dai dibenzofurani policlorurati (PCDFs) (Di Lella, 2010).

La percentuale di SO₂ nell'aria (6-7%) proveniente dal traffico veicolare (in particolare dai veicoli con motore diesel) è molto bassa e presenta una variazione stagionale piuttosto evidente, con i valori massimi nella stagione invernale, laddove sono maggiori gli impianti di riscaldamento domestico.

Per quanto concerne la concentrazione in aria delle polveri sottili è noto come essa sia strettamente dipendente dall'intensità e dalla natura del traffico veicolare.

Le marmitte catalitiche, in particolare, non sono in grado di limitare le quantità di polveri sottili immesse nell'ambiente, nonostante abbattano le emissioni di CO, NO_x ed idrocarburi incombusti fino al 90%.

Le polveri sottili sono, inoltre, un *carrier* di numerosi composti organici volatili (COV) ed elementi in traccia con più o meno spiccata valenza tossicologica, tra cui elementi pesanti tossici, per gran parte associati alle particelle carboniose che si formano nelle reazioni di combustione dei carburanti, essendo tali particelle in grado di assorbire sulla loro superficie un'ampia gamma di specie chimiche sia inorganiche che organiche.

La quantità di particolato atmosferico prodotta dagli scarichi dei veicoli circolanti su strada dipende principalmente dal tipo di carburante utilizzato (i veicoli diesel producono una maggiore quantità di particelle aerodisperse a causa dell'elevata viscosità del carburante che impedisce un'ottimale miscelazione con l'ossigeno e favorisce la formazione di prodotti intermedi allo stato solido e liquido) e dalla cilindrata del mezzo, in quanto i veicoli più potenti sono quelli che emettono una maggiore quantità di PM₁₀.

Elementi pesanti quali piombo, rame, zinco, manganese, cromo, cadmio e mercurio sono legati alla frazione incombusta delle reazioni di combustione dei carburanti (Swietlicki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003).

Zinco, cromo, cadmio e piombo, insieme ad arsenico ed antimonio, possono essere prodotti dal deterioramento di alcune componenti della struttura dei veicoli.

La presenza di zinco, rame e cadmio in aria legata al particolato atmosferico può derivare anche dal consumo dei pneumatici, così come quella di piombo, cromo,

manganese ed antimonio dall'usura del ferodo dei freni (Weckwerth, 2001; Manoli *et al.*, 2002).

Infine, gli elementi del gruppo dei platinoidi (essenzialmente platino, palladio e rodio) sono diventati contaminanti caratteristici delle zone a rilevante traffico veicolare, in quanto derivano dal deterioramento delle marmitte catalitiche in cui questi elementi sono utilizzati come catalizzatori.

Queste ultime sono responsabili della produzione di PM₁₀ per rilascio di particelle di platinoidi e di ammoniaca in caso di funzionamento non ottimale.

Dunque il traffico veicolare è uno dei fattori che determinano contaminazione atmosferica con conseguenze anche per la vegetazione.

In base ad imponenti ricerche di campo condotte in Olanda e in Inghilterra, van Dobben *et al.* (2001) e Davies *et al.* (2007) hanno identificato negli ossidi di azoto i principali responsabili del declino della flora lichenica sugli alberi lungo le strade.

D'altro canto, è stato documentato un aumento delle specie nitrofile, che suggerisce come l'azoto ossidato venga prontamente assimilato da alcune specie licheniche (van Herk, 2002; Cristofolini *et al.*, 2008).

1.1.2 La contaminazione atmosferica da agricoltura

Le attività agricole contribuiscono all'inquinamento atmosferico rappresentando la principale sorgente di emissioni di ammoniaca, inquinante responsabile, insieme al biossido di zolfo e agli ossidi di azoto, dei fenomeni di acidificazione ed eutrofizzazione, ed è a sua volta coinvolta nella formazione di polveri sottili in quanto precursore del particolato secondario.

Rispetto agli altri inquinanti l'ammoniaca ha però ricevuto una minore attenzione riflessasi nell'assenza di una normativa di riferimento. Tuttavia la sua importanza è destinata a crescere poiché il contributo all'acidificazione da parte di altri inquinanti sta diminuendo e sta crescendo l'attenzione rivolta al suo contributo all'eutrofizzazione e alla formazione di particelle secondarie.

Attualmente la normativa di riferimento per la riduzione delle emissioni di ammoniaca è rappresentata dal D.Lgs. del 21 maggio 2004, n° 171 "Attuazione della direttiva 2001/81/CE relativa ai limiti nazionali di emissione di alcuni inquinanti atmosferici", che fissa per l'ammoniaca il limite nazionale di emissione di 419 kt annue da raggiungere entro il 2010 allo scopo di "tutelare l'ambiente e la salute umana dagli effetti nocivi causati dall'acidificazione, dall'eutrofizzazione del suolo e dalla presenza di ozono al livello del suolo" (art. 1).

Le emissioni di ammoniaca sono riportate nell'inventario nazionale delle emissioni realizzato e gestito dall'APAT.

Per quanto riguarda le emissioni relative all'anno 2000^[2], risulta che il settore agricolo rappresenta da solo la quasi totalità delle emissioni di ammoniaca, con un contributo pari al 95% delle emissioni totali.

Emerge, dunque, l'importanza del contributo dei fertilizzanti azotati alle emissioni di ammoniaca che, invece, in molti casi viene ancora trascurato.

L'emissione in atmosfera avviene per lo più in seguito alla volatilizzazione, che si verifica quando nel terreno si forma ammoniaca gassosa (NH_3), contenuta direttamente nel terreno o derivante dai fertilizzanti, con particolare riferimento alla forma ureica.

Il tasso del fenomeno dipende, comunque, dal livello di umidità, dalla temperatura e dal pH. Se la superficie del terreno è umida l'acqua evapora passando nell'atmosfera e l' NH_3 viene portata nell'atmosfera con il vapore.

1.1.3 La contaminazione atmosferica da attività industriali

Gli impianti industriali possono alterare, nei loro processi produttivi, non solo l'acqua ed il suolo ma anche l'aria, emettendo sostanze inquinanti.

Per *emissione* si intende "qualsiasi sostanza solida, liquida o gassosa introdotta nell'atmosfera, proveniente da un impianto che possa produrre inquinamento atmosferico" (D.P.R. 203/88, art. 2, comma 4).

Molteplici sono le tipologie di attività industriali che concorrono al rilascio in atmosfera di sostanze inquinanti.

Le principali attività riguardano la produzione e la distribuzione di energia, gli impianti di termoutilizzazione, la produzione dell'acciaio, la fusione di metalli, la produzione di cemento, i processi metalmeccanici e di verniciatura.

Le emissioni di inquinanti nell'atmosfera da parte di cementifici, acciaierie, centrali termoelettriche ed industrie siderurgiche contribuiscono in misura notevole alla presenza di sostanze tossiche cancerogene, di polveri e di altri elementi che alterano profondamente l'originaria composizione chimica dell'aria.

Le attività industriali fanno arrivare in atmosfera una schiera molto numerosa e molto varia di sostanze inorganiche (ossidi di zolfo, di azoto, di carbonio, polveri, *etc.*) ed organiche.

L'industria nucleare, poi, rilascia in aria radionuclidi di varia natura ed il trasporto aereo si incarica, infine, di far arrivare anche nelle parti di atmosfera lontane dalle normali attività umane i prodotti della combustione.

1.1.3.1 L'industria del cemento

La produzione del cemento prevede una serie di fasi (Figura 1.1) che possono essere così sintetizzate:

- estrazione, stoccaggio e preparazione delle materie prime;
- preparazione del combustibile;
- cottura del clinker;
- macinazione del clinker e stoccaggio del cemento;
- imballaggio e spedizione.

L'estrazione di quasi tutte le materie prime naturali (calcare, calcare marnoso, scisto o argilla) richiede una serie di operazioni di escavazione ed estrazione.

I materiali provengono, di solito, da cave a cielo aperto che, nella maggior parte dei casi, sono prossime al cementificio. Possono essere usati anche le ceneri prodotte dalle centrali termoelettriche, le scorie d'altoforno ed altri residui di processi industriali, in funzione della loro idoneità dal punto di vista chimico, per sostituire, almeno in parte, le materie prime naturali.

Dopo una prima frantumazione le materie prime vengono trasportate al cementificio, dove vengono stoccate e sottoposte ad ulteriore lavorazione.

Il materiale greggio, in proporzioni controllate, viene macinato e amalgamato per formare una miscela omogenea avente l'opportuna composizione chimico - fisica.

Questa è la parte più importante del processo in termini di emissioni potenzialmente inquinanti, qualità e costo del prodotto.

Nella fase di cottura, per la produzione del clinker, la farina cruda viene immessa nel forno rotante dove viene sottoposta al processo di essiccazione, preriscaldamento, calcinazione e sinterizzazione. Il clinker viene dapprima raffreddato con aria e poi stoccato per l'uso successivo. Nel processo di cottura è importante che le temperature della carica del forno e del gas oscillino rispettivamente intorno a 1400-1500°C e circa 2000°C. L'ossido di calcio reagisce a tali temperature con silice, allumina e ossido ferroso per formare silicati, alluminati e ferriti di calcio che compongono il clinker.

Esso viene, quindi, frantumato e macinato insieme al gesso e ad altre aggiunte per produrre il cemento. I combustibili più utilizzati sono il petcoke, gli pneumatici, gli oli ed i combustibili da rifiuti.

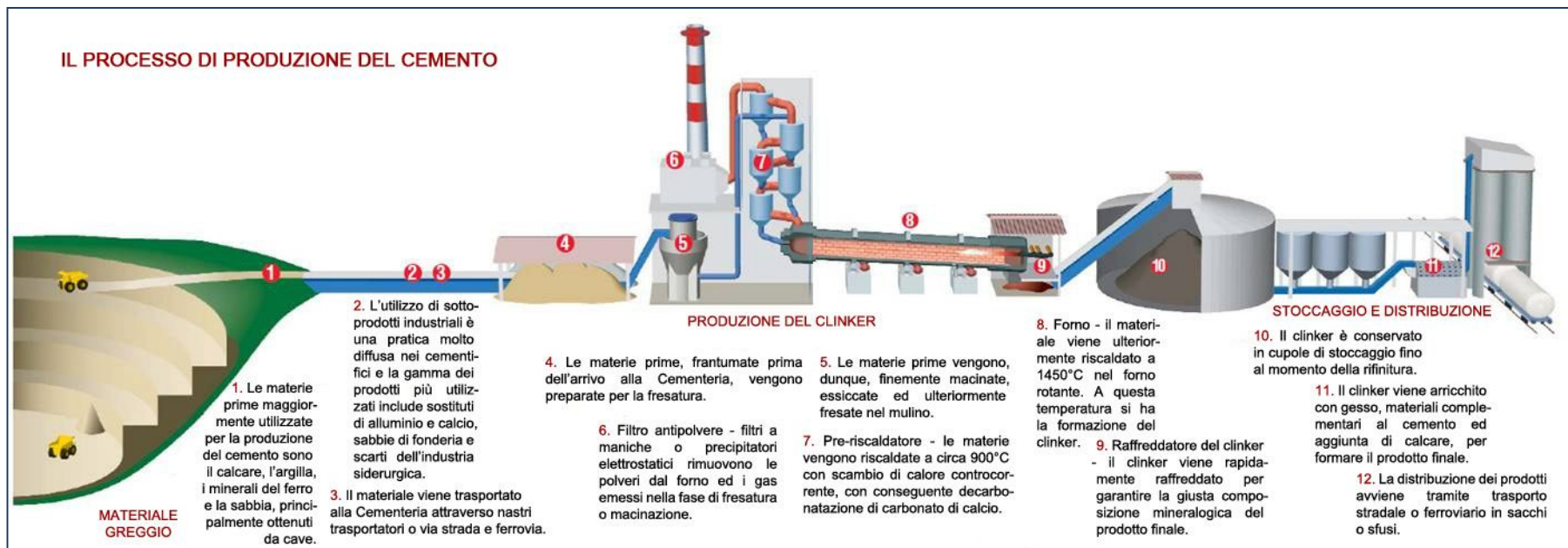


Figura 1.1 – Schema semplificato delle principali fasi costituenti il processo di produzione del cemento.

Le materie prime ed i combustibili contengono metalli che, durante le fasi di lavorazione, possono essere emessi in atmosfera (Tabb. 1.1 e 1.2).

Le polveri aerodisperse rappresentano l'incidenza preminente sul potenziale impatto con l'ambiente e devono essere considerate come un rischio specifico dipendente dalla caratterizzazione del processo, poiché sia le materie prime movimentate e sottoposte ai cicli di frantumazione e macinazione, sia il cemento prodotto, si presentano prevalentemente sotto forma di polveri fini e finissime.

Come in ogni processo di combustione, le emissioni gassose, principalmente ossidi di zolfo ed azoto, biossido e monossido di carbonio, sono ascrivibili esclusivamente alle operazioni di cottura ed essiccazione - macinazione. Altri inquinanti da considerare sono: l'acido fluoridrico, l'acido cloridrico, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i composti organici volatili (COV), i metalli ed i loro composti (Tab. 1.3).

Tradizionalmente, le emissioni di polveri, provenienti soprattutto dai camini dei forni, hanno costituito il principale aspetto negativo a livello ambientale che caratterizza la produzione del cemento.

Le principali fonti di polvere sono, oltre ai forni, i mulini del crudo, i raffreddatori del clinker ed i mulini per la produzione del cemento. In tutti questi impianti, grossi volumi di gas fluiscono attraverso materiali polverosi. La configurazione e l'affidabilità dei moderni precipitatori elettrostatici e dei filtri a tessuto garantisce emissioni di polveri ridotte a livelli minimali, con concentrazioni di PTS inferiori a 20 mg/Nm³, nelle normali condizioni di esercizio.

Emissioni di polveri diffuse possono liberarsi durante lo stoccaggio e la movimentazione dei materiali e dei combustibili solidi e anche dalle superfici stradali. Le polveri rilasciate durante le operazioni di imballaggio e spedizione del clinker/cemento possono anch'esse essere significative.

La fonte principale di polveri contenenti metalli è comunque il forno, compresi preriscaldatore, precalcinatore, forno rotante e raffreddatore del clinker.

| SITI DI EMISSIONE | | | | | | | | | | | |
|--|----|-----------------|---|-----------------|---|--------------------------|--|---------------------------------------|-----------------|---|--|
| | | Ames Iowa (USA) | | Ames Iowa (USA) | | St. Louis Missouri (USA) | | St. Louis Missouri (USA) | | Parainen (Finlandia) | |
| COMBUSTIBILI UTILIZZATI ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | | | | | | | | | | | |
| | | 100% carbone | 80% carbone; 20% rifiuti derivati da combustibili | 100% carbone | 50% carbone; 50% rifiuti derivati da combustibili | 100% carbone | 92% carbone; 8% rifiuti derivati da combustibili | 100% rifiuti derivati da combustibili | Carbone/petcoke | Pneumatici di scarto come combustibile secondario | |
| CONTAMINANTI NEL PARTICOLATO | Pb | 65 | 854 | 3120 | 14762 | 82 | 343 | 6169 | 3,89 | 7,2 | |
| | Zn | 454 | 1890 | 5316 | 18718 | 151 | 517 | 9421 | 14,4 | 46,01 | |
| | Fe | | | 26700 | 1500 | | | | | | |
| | Be | | | | | 1,2 | | | | | |
| | Ba | | | | | 402 | 497 | | | | |
| | Cr | 21 | 46 | 232 | 572 | 128 | 108 | 1884 | 3,33 | 21,1 | |
| | V | | | | | 97 | 111 | 56 | 7,78 | 10 | |
| | Se | 9 | 14 | 27 | 31 | 55 | 24 | 24 | | | |
| | Cu | 15 | 42 | | | 32 | 88 | 5047 | 1,11 | 3,3 | |
| | Cd | | | | | 4,8 | | 271 | 0,33 | 0,33 | |
| | Ni | 31 | 46 | | | | | | 2,22 | 4,4 | |
| | Mn | | | | | | | | 5,55 | 28,9 | |
| | As | 32 | 36 | | | 33 | 20 | | 3,33 | 1,51 | |
| | Sb | | | | | 29 | 5 | | | | |

Tabella 1.1 – Esempi di emissioni di contaminanti legate al tipo di combustibile utilizzato (Hall *et al.*, 1979; Fiscus *et al.*, 1977; Fiscus *et al.*, 1980; Edwards *et al.*, 1980; Mukherjee *et al.*, 2001).

| TIPOLOGIE DI COMBUSTIBILI | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------|--|---------|---|--|--|--|---|---------|
| | 100% Gas (µg/MJ) | 85% Gas; 15% Combustibili derivati da pneumatici (µg/MJ) | Petcoke | Petcoke (12000 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (4500 kg h ⁻¹) | Petcoke (9800 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (1500 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (1500 kg h ⁻¹) | Petcoke (9000 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (1000 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (3000 kg h ⁻¹) | Petcoke (11800 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (500 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (4000 kg h ⁻¹) | Petcoke (12000 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (5600 kg h ⁻¹) | |
| EMISSIONI | | | | | | | | | |
| | (Kg/Mg) | (Kg/Mg) | (Kg/Mg) | (mg Nm ⁻³) | (mg Nm ⁻³) | (mg Nm ⁻³) | (mg Nm ⁻³) | (mg Nm ⁻³) | |
| CONTAMINANTI NEL PARTICOLATO | Al | | | 0,0065 | | | | | |
| | As | 0,82 | 1,5 | 6,5x10 ⁻⁶ | 0,0012 | 0,0014 | 0,0037 | 0,0009 | 0,00102 |
| | Ba | 10,7 | 22,4 | 0,00018 | | | | | |
| | Ca | | | 0,12 | | | | | |
| | Cd | 0,60 | 0,56 | | 0,0002 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0003 | 0,00002 |
| | Cr | 35,8 | 137 | 3,9x10 ⁻⁶ | 0,0031 | | 0,0016 | 0,0024 | 0,00051 |
| | Cu | 1,4 | 1,3 | 0,0026 | 0,0124 | 0,0114 | 0,0167 | 0,0196 | 0,00165 |
| | Pb | 1,8 | 0,56 | 0,00036 | 0,0504 | 0,0206 | 0,0391 | 0,008 | 0,00065 |
| | V | 2,5 | 1,6 | | 0,0036 | 0,0062 | 0,0062 | 0,0013 | 0,00196 |
| | Fe | 99,63 | 72,37 | 0,0085 | | | | | |
| | K | | | 0,009 | | | | | |
| | Mn | | | 0,00043 | 0,011 | 0,0177 | 0,0197 | 0,0043 | 0,08546 |
| | Mg | | | 0,02 | | | | | |
| | Na | | | 0,02 | | | | | |
| | Se | | | 7,5x10 ⁻⁶ | | | | | |
| | Be | | | 3,3x10 ⁻⁷ | | | | | |
| | Sb | | | | 0,0004 | 0,0003 | 0,0004 | 0,0017 | |
| Mo | | | | | | | | | |
| Zn | 98,5 | 183,9 | 0,00027 | 0,0153 | 0,0209 | 0,0071 | <0,01 | 0,32963 | |
| Ni | 2,4 | 1,5 | | 0,0045 | 0,004 | 0,0041 | 0,00180 | 0,00261 | |

Tabella 1.2 – Tipologie di combustibili utilizzati nei processi di produzione del cemento^[3] (Reisman & Pechan, 1997; Conesa *et al.*, 2008; Branscome, 1984).

| TIPOLOGIE DI COMBUSTIBILI | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| | Petcoke (12000 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (4500 kg h ⁻¹) | Petcoke (9800 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (1500 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (1500 kg h ⁻¹) | Petcoke (9000 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (1000 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (3000 kg h ⁻¹) | Petcoke (11800 kg h ⁻¹); rifiuti da pneumatici (500 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (4000 kg h ⁻¹) | Petcoke (12000 kg h ⁻¹); fanghi di depurazione (5600 kg h ⁻¹) |
| EMISSIONI | | | | | |
| 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (pg Nm ⁻³) | 13,6 | 20,5 | 0,8 | 0,2 | 5 |
| 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano (pg Nm ⁻³) | 4,5 | 2,4 | 0,5 | 0,4 | 0,5 |
| 1,2,3,4,7,8-esaclorodibenzofurano (pg Nm ⁻³) | 26,8 | 4,3 | 0,2 | 0,8 | 0,5 |
| 1,2,3,4,6,7,8-eptaclorodibenzofurano (pg Nm ⁻³) | 45,5 | 6,8 | 157,7 | 4,1 | 8,7 |
| Octaclorodibenzofurano (pg Nm ⁻³) | 30,5 | 7,1 | 210,1 | 14,5 | 61,7 |
| Naftalene (mg Nm ⁻³) | 0,6394 | 0,407 | 13,0283 | | 0,3922 |
| Fenantrene (mg Nm ⁻³) | 0,0051 | 0,0030 | | 0,0017 | 0,0026 |
| Metano (mg Nm ⁻³) | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,005 |
| Etano (mg Nm ⁻³) | <0,002 | <0,002 | <0,002 | <0,002 | <0,002 |
| Benzene (mg Nm ⁻³) | 1,17 | 0,21 | 0,95 | | 0,49 |
| Toluene (mg Nm ⁻³) | 1,22 | 0,74 | 0,84 | | 0,53 |
| Xilene (mg Nm ⁻³) | 0,61 | 0,23 | 0,66 | | 0,51 |
| Stirene (mg Nm ⁻³) | 0,34 | 0,26 | 0,22 | | 0,15 |
| Acido cloridrico (mg Nm ⁻³) | 0,96 | <0,1 | 6,96 | | 4,39 |
| Acido fluoridrico (mg Nm ⁻³) | <0,1 | <0,1 | <0,1 | | <0,1 |
| Co (mg Nm ⁻³) | 0,0033 | 0,0034 | 0,0006 | 0,00030 | 0,00123 |
| Hg (mg Nm ⁻³) | <0,005 | <0,004 | 0,0091 | 0,025 | 0,00837 |
| Sn (mg Nm ⁻³) | 0,0068 | | 0,0007 | 0,0009 | 0,00047 |

Tabella 1.3 – Principali contaminanti emessi da un cementificio a seconda del combustibile utilizzato (Conesa *et al.*, 2008).

1.2 Meteorologia ed inquinamento atmosferico

La meteorologia riveste un ruolo determinante ed al tempo stesso complesso nell'interpretazione di molti fenomeni di inquinamento atmosferico.

Le forzanti meteorologiche interferiscono in modo sostanziale e non sempre facilmente comprensibile sul rapporto di causa - effetto tra emissioni di sostanze inquinanti e le relative concentrazioni misurate, rendendo la valutazione e la gestione della qualità dell'aria alquanto impegnativa.

Le scale spaziali e temporali sulle quali si sviluppano fenomeni che contribuiscono a giornate di pioggia o di sole sono talvolta diverse da quelle che determinano la dispersione o il ristagno degli inquinanti nella troposfera.

I fenomeni caratteristici delle scale spaziali e temporali più grandi possono influenzare o meglio interferire con quelli che avvengono a scale più piccole, costituendone in qualche modo le forzanti esterne; ovviamente il fenomeno inverso è presente ma molto meno evidente a livello fenomenologico globale.

Di solito le concentrazioni di inquinanti nell'aria sono minori quando il vento è moderato e l'atmosfera è instabile nei bassi strati. Al contrario, le concentrazioni degli inquinanti sono elevate in presenza di nebbia persistente oppure in assenza di vento o quando si è in presenza di inversioni termiche.

Le inversioni termiche sono dei fenomeni atmosferici che impediscono il normale rimescolamento delle masse d'aria: in genere, la temperatura dell'aria decresce man mano che aumenta l'altezza (circa 7°C per km) e questo fa sì che le masse d'aria più calde, essendo meno dense, salgano e si sostituiscano all'aria più fredda che scende.

Dal momento che quest'aria calda è anche quella più inquinata perché si trova nella zona delle maggiori emissioni inquinanti, ne risulta un rimescolamento dei vari strati della troposfera che porta ad una diminuzione della concentrazione dei contaminanti atmosferici. In alcuni casi, però, a causa dell'inversione termica si possono formare degli strati d'aria più calda a qualche decina o centinaia di metri d'altezza per cui lo strato sottostante non sale e ristagna al suolo; tale processo comporta inevitabili fenomeni di accumulo delle sostanze inquinanti.

Il fenomeno più rilevante si registra con il particolato: il tempo di permanenza in atmosfera delle polveri dipende principalmente dalla loro dimensione. In particolare, le particelle più grossolane si depositano al suolo nell'arco di poche ore e la distanza percorsa è di solito breve.

Tuttavia, in situazioni particolari, esse possono raggiungere gli strati più alti dell'atmosfera e percorrere anche notevoli distanze (e.g. si pensi alla sabbia desertica che raggiunge le nostre città). Al contrario, le particelle più fini di diametro, fino ad 1

μm , tendono a galleggiare e conseguentemente possono permanere in atmosfera per molti giorni con trasporti anche di centinaia di chilometri.

Le condizioni più favorevoli al permanere di situazioni di inquinamento da polveri si manifestano soprattutto nella stagione invernale, in presenza di particolari condizioni meteorologiche (alta pressione, elevata stabilità atmosferica, prolungata inversione termica, assenza di precipitazioni). A causa del perdurare di queste situazioni, si sono riscontrati elevati livelli di PM_{10} nell'aria, non solo nelle grandi città, ma, anche a notevoli distanze dalle sorgenti principali.

La rimozione delle polveri atmosferiche avviene tipicamente per deposizione secca (soprattutto per le particelle grossolane) oppure per deposizione umida legata alla formazione delle nuvole ed alle precipitazioni (Lena & Pirollo, 2010).

1.3 Il biomonitoraggio

Il monitoraggio della concentrazione degli inquinanti aeriformi è generalmente effettuato attraverso analisi chimiche tramite utilizzo di centraline automatiche che presentano, però, una serie di limitazioni e problematiche, tra le quali emergono: i costi elevati sia per l'acquisto che per il mantenimento delle centraline stesse; il numero limitato di parametri che possono monitorare; la discontinuità spaziale e temporale dei dati ottenuti, nonché l'errata ubicazione e l'assenza di informazioni sugli effetti sinergici degli inquinanti.

I limiti oggettivi delle centraline possono essere arginati affiancando ad esse un sistema di monitoraggio basato su organismi bioindicatori, in grado di fornire informazioni sul livello complessivo dell'inquinamento atmosferico anche in vaste aree.

Si definisce organismo bioindicatore ogni organismo vivente, animale o vegetale, che fornisce indicazioni sul livello di contaminazione di un'area determinata. In modo più specifico *"...per bioindicatori s'intendono tutti quegli organismi (o parti di essi) che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, etc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente (o di una parte di esso) e per bioaccumulatori quelli che assimilano dal suolo, dall'acqua o dall'atmosfera quantità misurabili di elementi chimici e/o composti xenobiotici"* (Bargagli et al., 1998).

Le principali caratteristiche dei bioindicatori sono: la sensibilità ai contaminanti di interesse; la capacità di reazione alle alterazioni ambientali; la facile identificazione e le adeguate conoscenze sull'anatomia, la fisiologia e l'ecologia della specie; l'ampia diffusione nell'area di studio; la scarsa mobilità e la facile reperibilità in ogni periodo dell'anno; il lungo ciclo vitale e l'uniformità genetica. Queste caratteristiche consentono, quindi, di esprimere una relazione tra risposta biologica e le concentrazioni di uno o più

contaminanti nell'ambiente, permettendo anche una valutazione in termini quantitativi del loro effetto sinergico.

Le principali caratteristiche dei bioaccumulatori sono: l'elevata tolleranza ai contaminanti di interesse; la notevole capacità di accumulo; l'ampia diffusione nell'area di studio; la scarsa mobilità ed il lungo ciclo vitale.

Per quanto detto fino ad ora il biomonitoraggio mediante bioindicatori si basa su misure biologiche, mentre quello tramite bioaccumulatori è connesso a determinazioni analitiche (e.g. concentrazione di elementi in traccia).

1.4 I licheni come biomonitors

I bioindicatori che forniscono indicazioni quantitative sui livelli di inquinamento e che permettono di identificare un cambiamento nel corso del tempo vengono definiti *biomonitors* (Manning & Feder, 1980; Sloof *et al.*, 1988; Nimis *et al.*, 1993).

Markert *et al.* (1997) hanno definito *biomonitors* quegli organismi il cui contenuto di certi elementi o composti e la cui struttura morfologica, istologica o cellulare, i cui processi metabolici, il cui comportamento o la cui struttura di popolazione ed i cambiamenti di tutti questi parametri, forniscono informazioni che permettono di quantificare la qualità dell'ambiente o cambiamenti nell'ambiente.

Partendo da quest'ultima definizione, i licheni possono essere considerati degli ottimi *biomonitors* del comparto aria.

È utile ricordare che i licheni sono funghi (*micobionti*) che vivono in simbiosi con alghe verdi o cianobatteri (*fotobionti*) e, diversamente dalle piante, non possiedono né radici né cuticola cerosa e dipendono esclusivamente dall'atmosfera per l'apporto di nutrienti minerali. L'associazione tra micobionte e fotobionte porta alla formazione di un organismo completamente nuovo, con un alto grado di organizzazione e con caratteri morfologici e fisiologici peculiari, non riscontrabili nei due partner osservati separatamente (Nash, 1996).

L'efficacia dei licheni come *biomonitors* è stata dimostrata in studi in cui è stata osservata la ricolonizzazione dei così detti *deserti lichenici* parallelamente alla riduzione delle concentrazioni di metalli pesanti e SO₂ (Seaward, 1979; Showman, 1981; van Dobben & de Bakker, 1996) ed in studi che hanno trovato una correlazione tra biodiversità lichenica, concentrazione di alcuni inquinanti ed incidenza di cancro al polmone nell'uomo (Cislaghi & Nimis, 1997).

L'utilizzo dei licheni come bioindicatori attraverso lo studio della loro distribuzione e abbondanza risale alla metà del XIX secolo (Grindon, 1859; Nylander, 1866). I primi studi organici hanno visto l'utilizzo di scale di sensibilità e di indici di qualità dell'aria

(Ferry *et al.*, 1973). Tali indici (tra i quali l'IAP, *Index of Atmospheric Purity*) sono stati in seguito standardizzati per quantificare la biodiversità dei licheni epifiti e utilizzarla per esprimere un giudizio sulla qualità ambientale (Kricke & Loppi, 2002; Asta *et al.*, 2002).

L'altra caratteristica che consente l'utilizzo dei licheni in studi di biomonitoraggio è la loro capacità di accumulare gli elementi in traccia (Nash & Sommerfeld, 1981; Loppi *et al.*, 2000; Loppi *et al.*, 2006).

Oltre a quantificare il contenuto totale di elementi in traccia, la localizzazione degli elementi nei vari distretti cellulari (Branquinho & Brown, 1994) può essere utile per meglio comprendere i possibili effetti tossici che possono produrre le suddette sostanze.

Riassumendo, le principali caratteristiche dei licheni sono:

- elevata capacità di assorbimento e di accumulo durante le cinetiche di sostanze in fase di vapore; mancando di aperture stomatiche, essendo sprovvisti di cuticola (funzione protettiva) e sprovvisti di apparato radicale, attuano gli scambi gassosi attraverso tutta la loro superficie accumulando, a livelli apprezzabili, in soluzione acquosa dalle precipitazioni umide ed in forma solida per intrappolamento del particolato aerodisperso, quei contaminanti atmosferici persistenti (*e.g.* metalli, radionuclidi, idrocarburi clorurati, fluoruri) difficilmente misurabili in campioni d'aria;
- resistenza allo stress idrico; in queste condizioni i licheni rallentano le proprie attività metaboliche per cui aumenta la loro resistenza ai contaminanti atmosferici;
- resistenza allo stress termico; la resistenza a basse temperature permette attività continua, anche nel periodo invernale, quando i livelli di inquinamento atmosferico sono in genere più elevati;
- elevato rapporto superficie/volume; i licheni sono caratterizzati in generale da un elevato rapporto superficie/volume, a cui si associa la caratteristica di non mutare morfologicamente durante la crescita stagionale;
- impossibilità di liberarsi delle parti vecchie o intossicate; i licheni non hanno la possibilità di liberarsi delle sostanze contaminanti accumulate nel tallo tramite meccanismi di escrezione attiva, come avviene invece nel caso delle piante superiori, attraverso meccanismi di abscissione fogliare;
- lento accrescimento e grande longevità del lichene; questo consente di ottenere una stima dell'inquinamento su tempi lunghi;
- sensibilità agli agenti inquinanti con risposte quantificabili; i licheni sono in grado di assorbire e trattenere al loro interno elevate concentrazioni di alcuni contaminanti persistenti (*e.g.* elementi pesanti ed idrocarburi

clorurati) senza subire alterazioni nel medio termine. Ciò li rende degli ottimi bioaccumulatori;

- sensibilità specie - specifica ad alcuni contaminanti; sulla base di esperimenti di fumigazione ed esposizione controllata, è stata dimostrata un'azione depressiva sull'attività metabolica dei licheni per le seguenti sostanze ed elementi chimici: anidride solforosa, ossidi di azoto, acido fluoridrico, piombo, zinco e cadmio.

I vantaggi, rispetto ad altre metodologie, riguardano la possibilità di poter realizzare reti di monitoraggio su vaste aree, basate su un'elevata densità di punti di campionamento; questo consente di realizzare mappe georeferenziate di contaminazione molto dettagliate, evidenziando così in modo chiaro le aree più degradate del territorio ed i fenomeni di trasporto degli inquinanti su media - larga scala.

Inoltre è possibile ottenere dati distinti e/o integrati su un'ampia gamma di contaminanti in tempi di ricerca brevi; verificare e perfezionare modelli matematici di dispersione relativi a sorgenti di contaminazione (e.g. centrali elettriche, inceneritori); ottenere risposte integrate degli effetti dell'ambiente (inquinato) sugli esseri viventi oltre che utili indicazioni sui fenomeni di contaminazione avvenuti nel passato.

Sfruttando la capacità dei licheni di assorbire ed accumulare i contaminanti persistenti che sono generalmente presenti nell'atmosfera in concentrazioni molto basse, negli ultimi anni questi organismi sono stati impiegati largamente nel monitoraggio di metalli, radionuclidi, non - metalli e composti xenobiotici.

Questa metodica è stata impiegata soprattutto in prossimità di sorgenti puntiformi dove, in assenza di flora lichenica spontanea, possono essere trapiantati licheni raccolti in aree non contaminate.

Tale tecnica non presenta particolari difficoltà in quanto, per le determinazioni analitiche, si fa ricorso alle comuni procedure spettrofotometriche, gas - cromatografiche o a rilevatori di radioattività. Inoltre presenta il vantaggio di non richiedere conoscenze lichenologiche approfondite, in quanto il lavoro viene di solito eseguito su una sola specie. Il biomonitoraggio dei contaminanti atmosferici mediante licheni permette di stimare indirettamente il loro grado di diffusione e quindi di individuare eventuali sorgenti di inquinamento.

Negli ultimi anni la letteratura si è arricchita di un notevole numero di studi sui licheni come bioaccumulatori e bioindicatori.

In Italia sono state condotte numerose indagini riguardanti centri urbani, territori comunali e provinciali, zone di interesse naturalistico ed aree con presenza di attività antropiche di diverso tipo: Udine (Nimis, 1986), Roma (Nimis & Tretiach, 1987),

regione Veneto (Nimis *et al.*, 1989, 1991; Nimis, 2000; Cislighi & Nimis, 1997), Macerata (Gasparo *et al.*, 1989), La Spezia (Nimis, 1990; Nimis *et al.*, 1993), Pescara (Recchia *et al.*, 1993), Savona (Castello *et al.*, 1994), Treviso (Nimis *et al.*, 1996), regione Friuli - Venezia Giulia (Nimis *et al.*, 1999), Gorizia (Nimis *et al.*, 2001), Trieste (Miani *et al.*, 2003; Skert *et al.*, 2006).

1.5 Bioaccumulo di elementi in traccia nei licheni

I licheni epifiti, in particolare quelli foliosi e fruticosi, sono largamente utilizzati nel monitoraggio dei livelli in aria di elementi in traccia, essendo in grado di accumularli anche in concentrazioni più elevate di quelle presenti in atmosfera.

L'utilizzo dei licheni come bioaccumulatori consente di effettuare confronti non soltanto spaziali, ma anche temporali.

Le variazioni del contenuto di elementi in traccia nei talli lichenici possono fornire utili informazioni sui *trend* di inquinamento ambientale e consentono di seguire l'andamento dei fenomeni di contaminazione nel tempo.

La mancanza di una cuticola cerosa e di stomi, infatti, rende possibile l'assorbimento di molte sostanze sull'intera superficie del lichene (Hale, 1983); in particolar modo i talli lichenici risultano essere i siti maggiormente deputati all'assorbimento delle sostanze provenienti dall'ambiente esterno.

Nel corso degli anni sono stati effettuati numerosi studi su tale tematica e, tenendo presente una precisa zonazione del tallo, è stato evidenziato che la parte più interna ha generalmente concentrazioni maggiori di diversi elementi rispetto a quella esterna (Bargagli *et al.*, 1987).

Ciò trova spiegazione nel fatto che la porzione più interna del tallo è più vecchia di quella esterna e quindi soggetta ad un maggior periodo di esposizione.

Le modalità con le quali i licheni accumulano gli elementi in traccia presenti nell'ambiente sono sostanzialmente riconducibili a tre tipologie:

- I. *intrappolamento di particolato;*
- II. *complessazione ionica extracellulare;*
- III. *complessazione ionica intracellulare.*

Tutti i licheni presentano gli stessi meccanismi di accumulo, ma il peso che le tre modalità hanno nella capacità di accumulo varia a seconda dell'elemento e della specie (Modenesi, 2003).

Nel primo caso si fa riferimento all'intercettazione di piccoli pezzi di materia solida di natura eterogenea, a variabile contenuto metallico, disperse nell'atmosfera in forma

di fumi, ceneri, polveri, aerosol di origine sia naturale sia antropogenica. Il particolato è osservabile sia all'esterno che all'interno dei talli (Bargagli & Mikhailova, 2002).

Esternamente l'intercettazione è favorita nelle forme di crescita fogliose e fruticose che sono dotate di superfici caratterizzate dalla presenza di strutture talline (e.g. *isidi*, *sorali*) in grado di favorire la cattura del particolato.

La penetrazione delle particelle all'interno del tallo è agevolata da interruzioni della continuità corticale (e.g. *pseudocifelle*, pori, rotture traumatiche o predisposte per la dispersione di strutture di propagazione); ciò è stato verificato attraverso osservazioni in microscopia elettronica ed in microanalisi (Garty, 2000).

La complessazione ionica extracellulare riguarda tanto la secrezione di sostanze, quali primariamente l'acido ossalico e secondariamente gli acidi malico, citrico, usnico, norstico, derivati dal benzofurano, depsidi e depsoni, che sviluppano complessi insolubili con i metalli precipitando sia in ambito medullare che sulla superficie esterna della parete cellulare, quanto la presenza di componenti interne della parete cellulare recanti gruppi carbossilici, fosforici, amminici ed ossidrilici che scambiano metalli pesanti "cationici" attraverso un processo pH dipendente (Bačkor & Loppi, 2009).

Il trasporto dei metalli all'interno dei talli coinvolge l'attività di *carriers* specifici e comporta il consumo di energia. Una volta all'interno delle cellule può attivarsi sia la sintesi di fitochelatine da parte del fotobionte (Pawleik-Skowrońska *et al.*, 2002) e di metallotioneine, probabilmente ad opera del micobionte (Rauser, 1995; Mejare & Bulow, 2001), sia il sequestro dei metalli all'interno di corpi concentrici tipici di Ascomiceti lichenizzati (Sanità Di Toppi *et al.*, 2004), dei vacuoli algali (Bačkor & Loppi, 2009) o di cloroplasti e mitocondri (Perales-Vela *et al.*, 2006). A parità di specie, l'accumulo degli elementi in traccia nei licheni dipende dalle caratteristiche dell'organismo bioaccumulatore quali l'età, la vitalità, lo stato metabolico e da altri parametri abiotici quali piovosità, temperatura, umidità, caratteristiche del substrato, *etc.* A tale proposito si deve ricordare il ruolo fondamentale svolto da nebbia e rugiada, contenenti una grande quantità di elementi chimici (Knops *et al.*, 1991), e dal suolo che, a causa della disgregazione litogenetica, rilascia nell'ambiente svariate sostanze; in particolar modo Cr, Mn e Ni derivano dalla disgregazione di rocce ultrabasiche, Pb e Zn da quelle silicee (Lounamaa, 1965).

Uno dei principali parametri in grado di influenzare le modalità di accumulo dei singoli elementi è la loro solubilità: Cd e Zn mostrano un'assunzione di tipo ionico, Pb e Cr, elementi largamente insolubili, sono assorbiti principalmente attraverso il particolato. In quest'ultimo caso risultano essere di significativa importanza le dimensioni delle particelle, in quanto più esse sono fini maggiore è la possibilità che vengano intrappolate nei talli lichenici.

I metalli originati dal substrato si definiscono *inquinanti geochimici*, anche se i fenomeni di contaminazione attribuibili al materiale originario ed in grado di produrre danni biologici sono di norma limitati ad aree ristrette.

La presenza di un metallo in un substrato dipende dal fatto che esso può sostituire nella struttura cristallina altri elementi, a raggio ionico e a carica simile. Conseguentemente i metalli tossici sono presenti nei terreni naturali come risultato della decomposizione del substrato pedogenetico.

Inizialmente la composizione di un terreno in metalli è in genere simile a quella della sua roccia madre; con il tempo tenderà a differenziarsi con un incremento o un decremento della concentrazione di ciascun elemento, sotto l'influenza della vegetazione, della topografia e, soprattutto, del clima.

È stato dimostrato che in campioni di lichene raccolti in aree non soggette ad inquinamento atmosferico, dove quindi la maggior parte del materiale sospeso nell'aria è costituito da particelle di suolo o roccia, le concentrazioni di alcuni elementi in traccia aumentano in proporzione al contenuto di Al, Fe o Ti (Bargagli, 1995).

Questa affermazione è stata confermata in studi effettuati in Toscana analizzando campioni di *Parmelia sulcata*, dove è stato verificato che la concentrazione di tali elementi è strettamente dipendente dalle caratteristiche delle condizioni locali (Loppi *et al.*, 1999).

1.6 Il particolato atmosferico

Con il termine *particolato* (*particulate matter*, PM) o *polveri totali sospese* (PTS) si fa riferimento all'insieme di particelle disperse in atmosfera, solide e liquide, aventi diametro aerodinamico (d_a) variabile fra circa 0,01 e 100 μm (Marconi, 2003).

Il particolato è costituito da una complessa miscela di sostanze, organiche ed inorganiche, allo stato solido o liquido che, a causa delle loro piccole dimensioni, restano sospese in atmosfera per tempi più o meno lunghi. Tra queste troviamo sostanze diverse come sabbia, ceneri, polveri, fuliggine, sostanze silicee di varia natura, sostanze vegetali, composti metallici, fibre tessili naturali ed artificiali, sali, elementi come il carbonio o il piombo, *etc.*

In base alla natura ed alle dimensioni delle particelle possiamo distinguere (Marconi, 1996): gli aerosol, costituiti da particelle solide o liquide sospese in aria e con un diametro inferiore a 1 μm ; le foschie, date da goccioline con diametro inferiore a 2 μm ; le esalazioni, costituite da particelle solide con diametro inferiore ad 1 μm e rilasciate solitamente da processi chimici e metallurgici; il fumo, dato da particelle solide di solito con diametro inferiore ai 2 μm e trasportate da miscele di gas; le polveri,

costituite da particelle solide con diametro fra 0,25 e 500 μm ; le sabbie, date da particelle solide con diametro superiore ai 500 μm .

Le particelle aerodisperse in atmosfera presentano forme irregolari, perciò sono descritte facendo riferimento al diametro aerodinamico equivalente (d_{ae}), definito come il diametro di una particella sferica avente densità unitaria ed un comportamento aerodinamico (in particolare la velocità di sedimentazione) uguale a quello della particella considerata nelle medesime condizioni di temperatura, pressione ed umidità relativa.

Il concetto di diametro aerodinamico equivalente è utile ai fini della classificazione del particolato in categorie. In tal senso si può ricorrere ai seguenti termini:

- PTS (particelle totali sospese): sono le particelle di dimensioni tali da restare in sospensione per un tempo sufficiente ad essere campionate con un sistema di campionamento rispondente a specifiche caratteristiche geometriche in relazione a determinati flussi di prelievo, aventi diametro aerodinamico inferiore a 100 μm .
- PM_{10} : è la frazione di particolato raccolta da un sistema di campionamento tale per cui le particelle con diametro aerodinamico uguale a 10 μm sono campionate con efficienza del 50%.
- $\text{PM}_{2,5}$: è la frazione di particolato raccolta da uno specifico sistema di campionamento tale per cui le particelle con diametro aerodinamico uguale a 2,5 μm sono campionate con efficienza del 50%; rappresentano circa il 60% del PM_{10} .

È convenzione, inoltre, suddividere il particolato atmosferico in funzione del diametro aerodinamico nelle seguenti frazioni:

- ❖ ultrafine: diametro aerodinamico compreso tra 0,01 e 0,1 μm . Generalmente queste particelle sono costituite dai prodotti della nucleazione omogenea dei vapori sovra saturi (SO_2 , NH_3 , NO_x e prodotti della combustione);
- ❖ fine: diametro aerodinamico compreso tra 0,1 e 2,5 μm . La loro formazione avviene per coagulo di particelle ultrafini ed attraverso i processi di conversione gas - particella (processo di nucleazione eterogenea), oppure per condensazione di gas su particelle preesistenti nell'intervallo di accumulazione. I maggiori costituenti di queste particelle nelle aree industrializzate sono i solfati, i nitrati, lo ione ammonio, il carbonio elementare e quello organico. A questi si aggiungono particelle di origine biologica come spore fungine, lieviti, batteri *etc.*;

- ❖ *coarse*: diametro aerodinamico compreso tra 2,5 e 100 μm . Tali particelle sono essenzialmente prodotte da processi meccanici (erosione, risospensione meccanica o eolica, macinazione) e contengono elementi presenti nel suolo e nei sali marini. Essendo inoltre relativamente grandi, tendono a sedimentare in tempi di poche ore o minuti, ritrovandosi spesso vicino alle sorgenti di emissione in funzione della loro altezza.

Il particolato atmosferico può essere di origine naturale, come ad esempio particelle di suolo erose e sollevate o risospese dal vento, spray marini, ceneri vulcaniche, materiale organico derivante da incendi di foreste, pollini, spore, *etc.* oppure di origine antropica, legato principalmente all'uso di combustibili fossili (produzione di energia, riscaldamento, mezzi di trasporto, *etc.*), ad attività industriali (raffinerie, processi chimici, operazioni minerarie, *etc.*) ed allo smaltimento di rifiuti (inceneritori).

Si ritiene che le particelle grossolane siano introdotte nell'ambiente soprattutto a causa di fenomeni naturali, mentre quelle più fini derivino per lo più dalle attività antropiche. A livello globale, le masse di particolato prodotte per cause naturali sono preponderanti rispetto a quelle prodotte dalle attività umane. Tuttavia le sorgenti antropiche sono in grado di immettere in atmosfera una maggior quantità di particelle contenenti sostanze tossicologicamente rilevanti per la salute e per l'ambiente.

Un'altra caratteristica tipica delle sorgenti antropiche è la tendenza alla concentrazione spaziale, che rende alcune zone maggiormente a rischio rispetto ad altre. Ne sono un tipico esempio i centri urbani e quelli industriali. Risulta dunque di fondamentale importanza monitorare e caratterizzare tali zone, per quantificare il contributo dato da ciascuna sorgente.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Area di studio

L'area oggetto di studio comprende la zona circostante il cementificio ITALCEMENTI (Fig. 2.1), sito in provincia di Cosenza, tra i comuni di Castrovillari e Frascineto, a 75 Km dal Capoluogo.

Il cementificio ha un'estensione di 895.000 m², è sito in prossimità dell'autostrada A3 ed in posizione decentrata rispetto Castrovillari, maggiore centro urbano dell'areale sottoposto ad indagine.

I prodotti che annovera sono oltre 40 tra cementi e leganti che possono essere classificati in quattro categorie:

- cementi grigi standard,
- cementi grigi per applicazioni specialistiche,
- cementi e leganti per applicazioni specifiche,
- leganti speciali per edilizia.



Figura 2.1 – Cementificio ITALCEMENTI.

Il cementificio ITALCEMENTI utilizza come materie prime calcari provenienti dalla cava Le Serre, gestita dal cementificio stesso, che vengono trasportati nella zona di stoccaggio attraverso 2,5 Km di nastri trasportatori; argilla e gesso, provenienti

rispettivamente dalla cava Stamiota e Striscioli - Vullo gestite da terzi; minerali di ferro, silice, fluorite e loppa, acquistati da terzi.

Oltre alle materie prime naturali, ITALCEMENTI utilizza materie alternative, quali: rifiuti refrattari da forni per processi ad alta temperatura, ceneri pesanti da incenerimento di rifiuti solidi urbani e assimilati, ceneri di pirite. I combustibili utilizzati sono il petcoke e gli oli, a cui seguono combustibili alternativi, quali: oli esausti, gomme e pneumatici, scarti di agricoltura, plastica.

La prima fase di lavorazione è la macinazione o fresatura e la successiva essiccazione. Le materie prime, opportunamente dosate ed eventualmente addizionate con correttivi, vengono trasformate in polvere finissima e avviate a deposito sotto forma di farina omogeneizzata. La macinazione avviene tramite due molini Tosi di diametro 4 x 8 m a circuito chiuso, ognuno della potenza di 2000 kW. La farina viene stoccata in 2 sili di omogeneizzazione e di deposito con capacità complessiva di 16.000 t, fino al momento di essere avviata ai forni, dove raggiunge una temperatura di 1450°C.

Dalla cottura si ottiene il clinker, i cui componenti conferiscono al cemento attività idraulica. Il clinker all'uscita dai forni viene poi sottoposto ad un processo di raffreddamento. Per la produzione del clinker la cementeria utilizza un forno Lepol a via semisecca, con diametro di 4,2-4,6 m e lunghezza di 61,7 m, dotato di raffreddatore Fuller e di elettrofiltro ITALCEMENTI.

Per la combustione viene utilizzato petcoke con limitato ricorso all'olio.

Il clinker viene poi depositato in un capannone ed in alcuni sili. La capacità massima di stoccaggio è 45.000 t.

La fase conclusiva del processo produttivo consiste nella macinazione del clinker con gesso ed eventuali costituenti secondari. Si ottengono così cementi adeguati ai più svariati tipi di impiego. La cementeria utilizza per la macinazione dei cementi due molini a circuito chiuso: un Tosi di diametro 4,6 x 9 m con potenza installata di 3300 kW ed un Tosi di diametro 4 x 8 m con potenza installata di 2000 kW.

I diversi tipi di cemento vengono stoccati in 8 sili di deposito con capacità complessiva di circa 10.000 t^[4].

Accanto al cementificio, che rappresenta una sorgente *puntiforme*, sia pure alquanto significativa di potenziali inquinanti gassosi e particellari, va annoverata la presenza dell'autostrada A3 che costituisce, invece, una sorgente *lineare* di tipologie di inquinanti atmosferici relativamente sovrapponibili a quelli emessi dall'impianto industriale.

Il distretto territoriale individuato per lo svolgimento del monitoraggio atmosferico risulta piuttosto antropizzato perché comprende le aree urbane di Frascineto, Eianina e l'estremo versante orientale di Castrovillari e risulta, inoltre, caratterizzato da uno

sfruttamento agricolo del suolo abbastanza diffuso, sotto forma di colture arboree e soprattutto di cerealicoltura, una forma di produzione agricola che richiede intense lavorazioni meccaniche come pure un'elevata fertilizzazione azotata.

Frequenti sono i boschi di conifere, periodicamente soggetti a taglio e, in alcuni casi, visibilmente deturpati dallo sviluppo di incendi interessanti aree anche di dimensioni sensibili. Sono rilevabili, infine, delle zone destinate allo smaltimento incontrollato di terra di risulta, rifiuti e pneumatici usati.

Da un punto di vista litologico l'area è costituita da depositi sedimentari marini e continentali con prevalenza di terreni sciolti da granulari a coesivi, facilmente erodibili, e rocce carbonatiche con struttura da massiva a stratificata.

2.2 Disegno sperimentale

Trattandosi di uno studio relativo alla valutazione della diffusione di inquinanti atmosferici, elemento propedeutico all'individuazione dei siti più idonei per la realizzazione delle attività di monitoraggio è risultata la frequenza, su base annua, della direzione di "provenienza" dei venti, così da verificare quali fossero in tal senso "i versanti prevalenti" e quindi le "potenziali" aree maggiormente soggette alla propagazione degli inquinanti emessi dalle principali sorgenti locali.

Recuperando e graficando i dati relativi a tale tipo di informazione (Fig. 2.2), forniti dal Cementificio ITALCEMENTI di Castrovillari, è stato possibile verificare che, in un anno, per due terzi dei giorni i venti spirano da ovest (nord/sud-ovest) verso est.

Successivamente, utilizzando delle carte topografiche IGM 1:25.000 è stata individuata una griglia di monitoraggio predisposta sul territorio in modo da recare al centro di essa l'impianto dell'ITALCEMENTI e costituita da 25 Unità di Campionamento Primarie (UCP) e da 36 Unità di Campionamento Secondarie (UCS), individuate nell'ambito delle 9 UCP più "interne" (disposte a corona intorno al cementificio) (Fig. 2.3). Tutte le Unità di Campionamento hanno geometria quadrata con le Primarie aventi lato di 1 km e quelle Secondarie di 500 m.

Attraverso i successivi sopralluoghi effettuati nell'area di studio solo 44 delle iniziali complessive 52 Unità di Campionamento sono risultate idonee per lo svolgimento delle attività sperimentali. Le caratteristiche topografiche del territorio rendevano, infatti, problematico l'accesso alle rimanenti 8 Unità compromettendo il criterio di una "relativa" equispaziatura dei siti di monitoraggio tale da consentire la migliore copertura territoriale possibile. Ai fini di dettagliare meglio l'area soggetta ad inquinanti atmosferici, si è implementato, a partire dal terzo trapianto lichenico, il numero di stazioni di campionamento, per un totale di 63 siti. In ogni unità di

campionamento è stato individuato il relativo “sito di monitoraggio” e, tramite rilevatore satellitare (GPS), ne sono state determinate le coordinate geografiche ed UTM.

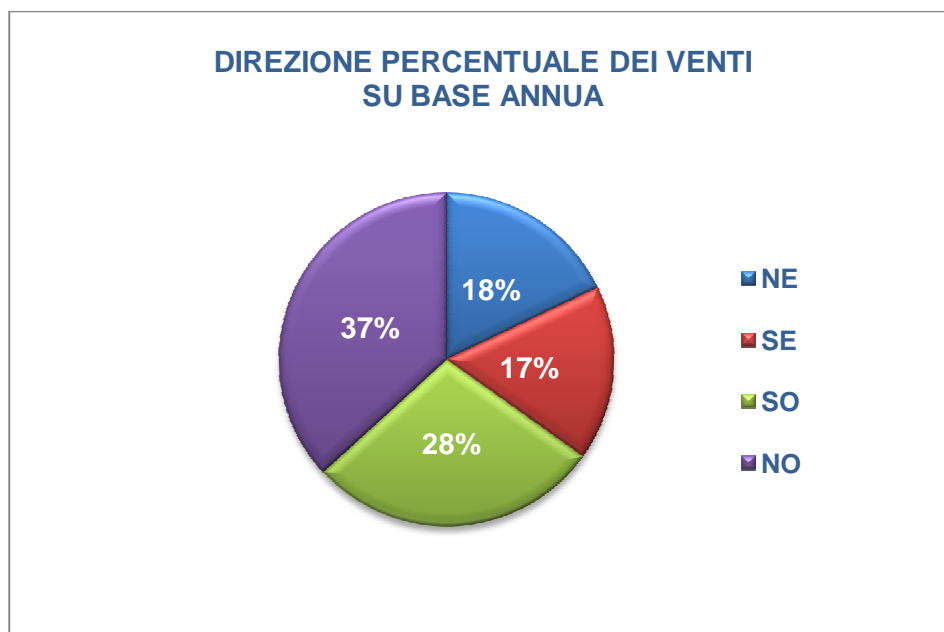
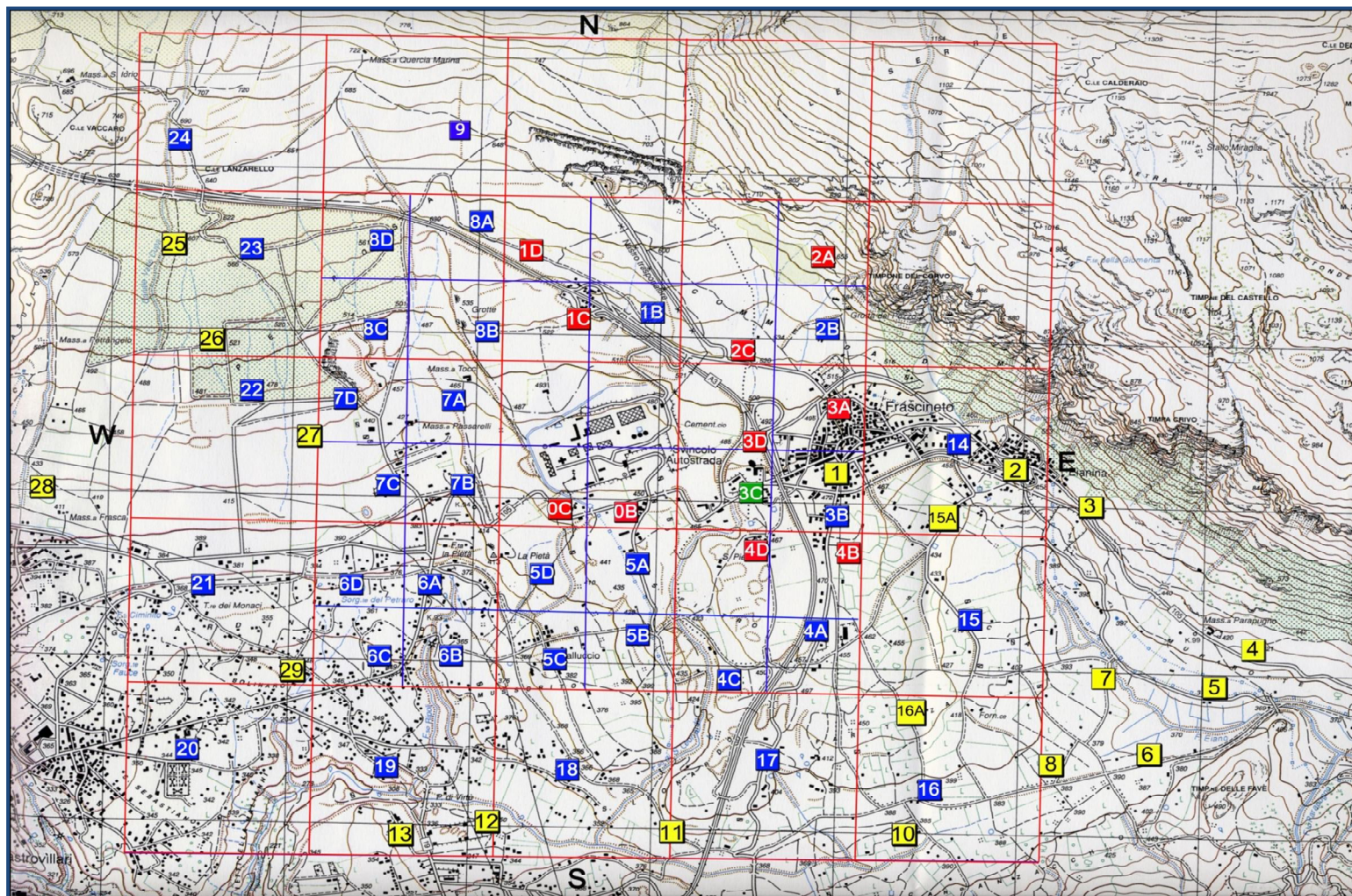


Figura 2.2 – Direzione dei venti su base annua.

Ai fini della valutazione della distribuzione territoriale degli inquinanti e delle relative concentrazioni si è deciso di utilizzare dei campionatori “passivi” ed un campionatore “attivo”, insieme ad un organismo *biomonitor*, la specie lichenica *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, sotto forma di talli “trapiantati” da un’area sorgente non contaminata.

Si è scelto di usare la metodologia dei trapianti piuttosto che monitorare le comunità dei licheni presenti in zona sia perché queste risultavano virtualmente assenti (fatte rare eccezioni) sia perché in tal modo è possibile definire esattamente l’intervallo temporale di esposizione dei talli e, quindi, riferire le concentrazioni di inquinanti bioaccumulate dal lichene ad un “delta” temporale ben preciso, così da potere stimare, nel miglior modo possibile, i livelli di esposizione a tali inquinanti dei licheni nell’area studiata. Per quanto riguarda il tempo di esposizione si è deciso di esporre i trapianti per periodi di 3 mesi, in quanto periodi compresi tra 1 e 3 mesi sono ritenuti i più idonei dal momento che per tempi più lunghi i licheni trapiantati possono perdere parte della loro biomassa o essere saturati in alcuni elementi, con conseguente trasformazione ed alterazione della loro superficie e delle loro *performance* fisiologiche (Bargagli & Mikhailova, 2002; Mikhailova, 2002).



LEGENDA

■ Sito in cui sono stati posizionati i licheni per il primo ed il secondo trapianto

■ Sito in cui sono stati posizionati i licheni per tutti i trapianti ed il campionatore attivo

■ Sito in cui sono stati posizionati i licheni per tutti i trapianti ed i campionatori passivi

■ Sito in cui sono stati posizionati i licheni per il terzo ed il quarto trapianto

□ = 1 Km²

Figura 2.3 – Griglia di campionamento.

Va ricordato che esiste un'ampia letteratura che dimostra come i licheni siano degli efficaci bioaccumulatori soprattutto di metalli pesanti grazie alla loro completa dipendenza "trofica" dall'atmosfera, alla mancanza di stomi, alla crescita estremamente lenta ed alla tendenza a "sequestrare" i metalli incorporati nella loro biomassa in comparti tissutali (*medulla*), preservando efficacemente "la memoria" della dimensione dell'esposizione ad essi (Bari *et al.*, 2001; Sloof, 1995; Loppi, 1996).

Quale zona "sorgente" dei talli da trapiantare è stata scelta un'area non contaminata (località La Fossiateda) nell'ambito dell'altopiano della Sila.

Le attività di monitoraggio hanno avuto inizio a maggio 2010 e si sono concluse ad aprile 2011.

In tutte le Unità di Campionamento (UCP ed UCS) sono stati collocati tre talli lichenici, per un totale di 132 trapianti per i primi sei mesi (maggio 2010 - ottobre 2010) e 189 nei rimanenti sei mesi (novembre 2010 - aprile 2011), prevedendone la sostituzione con cadenza trimestrale.

I campionatori passivi (in numero di 10) e quello attivo sono stati posizionati in un "set" ristretto di Unità di Campionamento Secondarie tenendo conto, essenzialmente, della direzione prevalente del vento, per cui i primi sono stati posti soprattutto ad est della centrale (e secondariamente nelle altre direzioni), mentre il campionario attivo è stato collocato in un punto ritenuto "potenzialmente" ad elevata esposizione alle masse d'aria inquinanti, nella centrale ANAS di Castrovillari (stazione 3C) sita in corrispondenza dello svincolo dell'autostrada A3 e posta in adiacenza al cementificio, nonché sottovento ad esso.

La sostituzione dei campionatori passivi è avvenuta con cadenza mensile, mentre quello attivo ha eseguito un campionamento del PM_{2,5} e del PM₁₀ per un periodo di 15 giorni consecutivi per i quattro trimestri (posizionandolo intorno alla metà del trimestre di esposizione dei talli lichenici).

2.3 Attività di campo

2.3.1 Ricerca delle stazioni di campionamento

Per dare efficacia alle attività di monitoraggio il posizionamento tanto dei licheni quanto dei campionatori nelle UCP ed UCS è stato realizzato seguendo due criteri: l'ottimizzazione dell'esposizione, per intercettare adeguatamente le masse d'aria in movimento con i relativi contaminanti e la garanzia di "permanenza" di licheni e campionatori nei siti designati, collocandoli, laddove possibile, all'interno di proprietà private o, diversamente, ad un'altezza (su alberi o pali di sostegno dei cavi elettrici) che rendesse difficile la loro rimozione o l'esecuzione di atti vandalici.

Ogni sito è stato opportunamente georeferenziato mediante GPS (Tab. 2.1).

| SITO | NORTHING | EASTING | LATITUDINE | LONGITUDINE |
|------|-------------|------------|--------------|--------------|
| 0B | 4409840,380 | 606735,564 | 39°49'52,27" | 16°14'50,21" |
| 0C | 4409792,438 | 606415,254 | 39°49'50,86" | 16°14'36,71" |
| 1 | 4410092,48 | 607950,30 | 39°50'2,12" | 16°15'41,7" |
| 1B | 4411026,529 | 606832,652 | 39°50'30,69" | 16°14'54,99" |
| 1C | 4411023,260 | 606598,302 | 39°50'30,69" | 16°14'45,13" |
| 1D | 4411477,900 | 606005,539 | 39°50'45,7" | 16°14'20,46" |
| 2 | 4410124,09 | 608781,10 | 39°50'2,98" | 16°16'16,66" |
| 2A | 4411410,698 | 607816,646 | 39°50'42,7" | 16°15'36,61" |
| 2B | 4411186,221 | 607840,254 | 39°50'35,41" | 16°15'37,47" |
| 2C | 4410702,768 | 607342,120 | 39°50'19,96" | 16°15'16,23" |
| 3 | 4409833,89 | 609305,41 | 39°49'53,33" | 16°16'38,54" |
| 3A | 4410505,481 | 607895,733 | 39°50'13,31" | 16°15'39,4" |
| 3B | 4409837,875 | 607920,363 | 39°49'51,65" | 16°15'40,04" |
| 3C | 4410028,378 | 607366,797 | 39°49'58,08" | 16°15'16,87" |
| 3D | 4410201,568 | 607446,153 | 39°50'3,66" | 16°15'20,31" |
| 4 | 4409006,13 | 610163,90 | 39°49'26,08" | 16°17'14,15" |
| 4A | 4409115,017 | 607875,627 | 39°49'28,23" | 16°15'37,73" |
| 4B | 4409587,386 | 607980,009 | 39°49'43,5" | 16°15'42,4" |
| 4C | 4408725,300 | 607442,384 | 39°49'15,79" | 16°15'19,28" |
| 4D | 4409652,401 | 607516,158 | 39°49'45,82" | 16°15'22,93" |
| 5 | 4408740,39 | 610217,75 | 39°49'15" | 16°17'16" |
| 5A | 4409453,520 | 606857,229 | 39°49'39,67" | 16°14'55,1" |
| 5B | 4409164,177 | 606873,395 | 39°49'30,28" | 16°14'55,61" |
| 5C | 4408793,431 | 606447,453 | 39°49'18,45" | 16°14'37,48" |
| 5D | 4409319,169 | 606333,144 | 39°49'35,55" | 16°14'32,98" |
| 6 | 4408236,84 | 609511,55 | 39°48'59" | 16°16'46" |
| 6A | 4409144,008 | 605687,148 | 39°49'30,16" | 16°14'5,71" |
| 6B | 4408967,393 | 605827,265 | 39°49'24,37" | 16°14'11,5" |
| 6C | 4408890,265 | 605512,072 | 39°49'22,01" | 16°13'58,2" |
| 6D | 4409388,545 | 605194,199 | 39°49'38,31" | 16°13'45,12" |

| | | | | |
|-----|-------------|------------|--------------|--------------|
| 7 | 4408975,79 | 609429,64 | 39°49'23" | 16°16'43" |
| 7A | 4410426,233 | 605798,062 | 39°50'11,69" | 16°14'11,12" |
| 7B | 4409930,117 | 605780,432 | 39°49'55,61" | 16°14'10,09" |
| 7C | 4409970,607 | 605541,404 | 39°49'57,03" | 16°14'0,06" |
| 7D | 4410513,270 | 605222,009 | 39°50'14,77" | 16°13'46,94" |
| 8 | 4408292,74 | 609106,47 | 39°49'01" | 16°16'29" |
| 8A | 4411607,912 | 605840,672 | 39°50'49,99" | 16°14'13,6" |
| 8B | 4410830,237 | 606045,181 | 39°50'24,68" | 16°14'21,75" |
| 8C | 4411089,357 | 605179,855 | 39°50'33,47" | 16°13'45,5" |
| 8D | 4411515,764 | 605398,149 | 39°50'47,2" | 16°13'54,93" |
| 9 | 4412149,822 | 605802,512 | 39°51'7,58" | 16°14'12,31" |
| 10 | 4407848,61 | 608232,85 | 39°48'47" | 16°15'52" |
| 11 | 4407758,43 | 607083,04 | 39°48'44,6" | 16°15'03,6" |
| 12 | 4407769,86 | 606131,58 | 39°48'45,4" | 16°14'23,6" |
| 13 | 4407771,52 | 605582,19 | 39°48'45,7" | 16°14'00,5" |
| 14 | 4410255,956 | 608568,517 | 39°50'4,91" | 16°16'7,55" |
| 15 | 4409152,352 | 608640,290 | 39°49'29,09" | 16°16'9,91" |
| 15A | 4409626,13 | 608650,48 | 39°49'46,89" | 16°16'10,87" |
| 16 | 4408183,515 | 608429,541 | 39°48'57,77" | 16°16'0,47" |
| 16A | 4408248,86 | 608405,55 | 39°48'59,9" | 16°15'59,5" |
| 17 | 4408403,765 | 607625,489 | 39°49'5,28" | 16°15'26,79" |
| 18 | 4408221,802 | 606454,925 | 39°48'59,91" | 16°14'37,46" |
| 19 | 4408221,016 | 605439,727 | 39°49'0,34" | 16°13'54,77" |
| 20 | 4408246,047 | 604363,067 | 39°49'1,63" | 16°13'9,51" |
| 21 | 4409325,977 | 604453,443 | 39°49'36,61" | 16°13'13,93" |
| 22 | 4410434,251 | 604654,423 | 39°50'12,46" | 16°13'23,02" |
| 23 | 4411347,039 | 604676,406 | 39°50'42,05" | 16°13'24,47" |
| 24 | 4412128,680 | 604263,069 | 39°51'7,58" | 16°13'7,53" |
| 25 | 4411272,25 | 604506,99 | 39°50'39,7" | 16°13'17,3 |
| 26 | 4410671,97 | 604584,13 | 39°50'20,2" | 16°13'20,2" |
| 27 | 4409922,29 | 605010,45 | 39°49'55,7" | 16°13'37,7" |
| 28 | 4409611,56 | 603707,01 | 39°49'46,2" | 16°12'42,7" |
| 29 | 4408765,25 | 604964,5 | 39°49'18,2" | 16°13'35,1" |

Tabella 2.1 – Coordinate piane UTM e coordinate geografiche dei siti di trapianto dei talli lichenici.

2.3.2 Prelievo e trapianto dei talli lichenici

Il metodo dei trapianti lichenici è ampiamente utilizzato in ricerche sulla qualità dell'aria in siti contaminati (e.g. aree urbane ed industriali), fornendo informazioni integrate relative all'intero periodo di monitoraggio/esposizione, non influenzate da cambiamenti di breve durata nella concentrazione dei contaminanti atmosferici (Sloof, 1995; Garty *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 2004; Ayrault *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2008;

Pacheco *et al.*, 2008), nonostante tale metodo non sia del tutto standardizzato per quanto concerne la quantità di lichene da esporre ed il tempo di esposizione.

L'ampio utilizzo dei trapianti lichenici, invece dei licheni cresciuti in posto, deriva sostanzialmente dall'assenza di specie licheniche nei siti di interesse, dall'uniformità nel biomonitoraggio per quanto concerne la superficie lichenica, dalla superficie di intrappolamento, dalla collocazione e dal periodo di esposizione del trapianto, dalla flessibilità nella selezione dei siti di esposizione e del loro numero, dalla conoscenza delle concentrazioni degli elementi chimici prima dell'esposizione, dalle informazioni di tipo integrato nel tempo e dalle migliori valutazioni del comportamento e del *trend* di accumulo degli elementi chimici. I limiti principali della tecnica dei trapianti lichenici sono riconducibili ai tempi di esposizione ed al differente e non conosciuto *rate* di accumulo dei contaminanti atmosferici, come alcuni elementi in traccia. Le *performance* nel bioaccumulo dipendono, inoltre, dalle condizioni climatiche ed ambientali oltre che dalle differenze ecofisiologiche delle diverse specie licheniche che si ripercuotono sui meccanismi di accumulo degli elementi in traccia.

La *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (Fig. 2.4) è una specie meso - xerofitica molto comune nella fascia montana e subalpina del nostro Paese, caratterizzata da un tallo foglioso - fruticoso, con un unico punto di fissaggio al substrato, e lobi chiaramente dorsoventrali, più o meno revoluti, divisi dicotomicamente, di circa 1-4 mm in larghezza, e ricoperti spesso da *isidi* eretti o più o meno appiattiti.

La superficie superiore si presenta di colore grigio, mentre quella inferiore è nera o bruno biancastra, spesso rosata all'apice dei lobi.



Figura 2.4 – Tallo di *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf.

La specie ha apoteci lecanorini, di grandi dimensioni, con disco color nocciola scuro e spore ellissoidi, semplici ed incolori. Si instaura preferibilmente su scorza acida, predilige luce solare indiretta e mal tollera livelli di eutrofizzazione anche moderati.

Complessivamente sono stati trapiantati 3 talli in ogni Unità di Campionamento.

Sia la raccolta che la successiva manipolazione dei talli, associati al loro rametto, è avvenuta con adeguata delicatezza ed utilizzando guanti in lattice per evitare di contaminare il campione. I talli sono stati trasportati in laboratorio all'interno di buste di polietilene e, successivamente, trasportati nei siti di trapianto, dove i rametti sono stati legati con fascette di rafia agli "elementi di supporto" (alberi o pali di sostegno della rete elettrica) rinvenuti *in situ* (Figg. 2.5, 2.6).



Figura 2.5 – Trapianto dei licheni nell'area di studio.



Figura 2.6 – Posizionamento dei talli lichenici in un sito di studio.

2.3.3 Posizionamento dei campionatori passivi

I campionatori a diffusione (passivi) (Fig. 2.7) utilizzati nel presente studio sono del tipo “analyst”, un brevetto (n° RM 98–000584) sviluppato dall’Istituto sull’Inquinamento Atmosferico del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Roma e trovano applicazione elettiva nell’attuazione delle disposizioni di legge indicate dal D.M. n° 60 del 02/04/2002.



Figura 2.7 – Campionatori passivi.

Essi sono in grado di raccogliere i gas ed i vapori inquinanti presenti nell’aria senza far uso di aspirazione forzata. Il campionatore è costituito da un cilindro in vetro a fondo cieco, filettato all’apertura (Fig. 2.8). Il materiale assorbente, posizionato all’interno del campionatore, è protetto da una reticella di acciaio inossidabile a maglia fine. Completa la struttura un tappo a vite in materiale plastico, forato al centro, con la parte interna rivestita da una membrana di tenuta in gomma - teflon.



Figura 2.8 – Filtri di tipo Analyst.

Un ulteriore elemento è costituito da una barriera anti - turbolenza in alluminio con rete in acciaio inox. Tale dispositivo ha la funzione di rendere il campionamento indipendente dalle turbolenze dell'atmosfera.

È di tipo “monouso” e concepito per essere impiegato anche come fiala di estrazione, senza che si debba ulteriormente manipolare il materiale assorbente durante la fase di analisi.

Il campionamento avviene semplicemente esponendo all'aria il dispositivo aperto per un tempo prefissato in funzione della presunta concentrazione della specie di interesse. Il tempo di esposizione è l'intervallo di tempo che passa tra l'apertura e la chiusura del dispositivo.

L'esposizione è stata realizzata fissando i filtri, con l'apertura verso il basso, al fondo di un supporto circolare (mediante “pinze” metalliche relativamente flessibili) dotato di un braccio che consentiva di vincolare, a mezzo di fascette in plastica, il dispositivo al ramo di un albero o ad un adeguato manufatto umano (e.g. pali della rete elettrica) (Fig. 2.9).

Terminato il tempo di esposizione prestabilito i filtri sono stati rimossi e portati in laboratorio per la determinazione delle concentrazioni degli inquinanti in fase vapore.



Figura 2.9 – Filtri con relativo supporto espositivo (*shelter*) collocati in un sito di campionamento.

2.3.4 Posizionamento del campionatore attivo

Nell'area di studio è stato posizionato un campionatore dicotomo Andersen Instruments Inc., 500 Technology Court, Smyrna, GA 30082 (800) 241 - 6898 in un'unica stazione sita in prossimità dello svincolo autostradale, nell'area di proprietà dell'ANAS (Fig. 2.10).



Figura 2.10 – Collocazione del campionatore attivo in area “retrostante” la sede ANAS di Castrovillari.

Il campionatore consiste di due parti o moduli: un modulo di campionamento ed un modulo di controllo del flusso (Fig. 2.11).



Figura 2.11 – Modulo di controllo del flusso.

Esso raccoglie le particelle inalabili (particelle $< 10 \mu\text{m}$) e le separa in base alla loro taglia in particelle grossolane ($2,5\text{-}10 \mu\text{m}$) e fini ($< 2,5 \mu\text{m}$).

Le particelle sono raccolte su filtri in teflon montati su un anello di 37 mm di diametro (Fig. 2.12).



Figura 2.12 – Alloggiamenti dei filtri per il PM_{10} ed il $\text{PM}_{2,5}$.

In base alla velocità di flusso settata ed alla capacità di ritenzione dei filtri è stato necessario eseguire la sostituzione di questi ultimi ogni 24 ore fino a coprire un intervallo complessivo di 15 giorni. Ogni singolo filtro, una volta rimosso, veniva richiuso all'interno di idonea custodia sigillante (Fig. 2.13), così da evitarne l'esposizione all'atmosfera dell'ambiente in cui questi venivano progressivamente stoccati durante il periodo di monitoraggio, al termine del quale si è provveduto al trasporto dei filtri in laboratorio per l'esecuzione delle analisi di caratterizzazione del PM_{10} e del $\text{PM}_{2,5}$.



Figura 2.13 – Filtri per il PM_{10} ed il $\text{PM}_{2,5}$.

2.4 Attività di laboratorio

2.4.1 Saggi ecofisiologici sui talli lichenici

Tutti i talli provenienti da esperienze di campo, prima di essere conservati in congelatore a -80°C, sono stati rimossi dal proprio rametto e puliti dal materiale grossolano. Prima di effettuare i saggi ecofisiologici, i talli sono stati acclimatati per 24 ore in camera umida.

2.4.1.1 Vitalità dei talli lichenici

Un modo semplice per valutare la vitalità dei licheni consiste nel misurare la capacità di ridurre il 2,3,5 - trifeniltetrazolio cloruro (TTC) a trifenilformazano (TPF) (Bačkor & Fahselt, 2005), processo che viene realizzato dalle deidrogenasi che operano a livello della catena di trasporto elettronico mitocondriale (Towill & Mazur, 1975).

Metodo.

Il metodo prevede l'incubazione, al buio, per 20 ore, alla temperatura di 25°C, di 15 mg di lacinia in 2 mL di 0,6% di trifeniltetrazolio cloruro in tampone fosfato 0,05 M (pH 6,8), contenente lo 0,005% di Triton X100. Successivamente si provvede al completo allontanamento del Triton X100 ed all'estrazione cellulare del trifenilformazano mediante aggiunta di 2 mL di dimetilsolfossido, incubazione a 65°C per 2 ore e successivo passaggio su vortex per 2 minuti.

La purificazione del TPF dal *debris* cellulare avviene aggiungendo 4 mL di *n* - esano (per analisi di residui), passando al Vortex per 1 minuto e centrifugando a 400 g per 15 minuti.

A fine centrifugazione si raccoglie il sovrantante (*n* - esano) e si legge l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 492 nm, utilizzando uno spettrofotometro UV - visibile (Perkin Elmer Lambda 4).

2.4.1.2 Danneggiamento delle membrane cellulari dei talli lichenici

Un test semplice per valutare l'integrità delle membrane cellulari consiste nell'immergere un frammento di tallo lichenico in acqua deionizzata e misurare la variazione di conducibilità elettrica (Simon, 1974; Marques *et al.*, 2005).

Le soluzioni che si ottengono con licheni esposti a composti inquinanti hanno valori di conducibilità elettrica più alti rispetto ai controlli (Pearson & Henriksson, 1981).

Questo incremento è determinato soprattutto dalla concentrazione degli ioni K⁺, che risulta proporzionale alla durata dell'esposizione ed alla concentrazione dei composti chimici.

Quindi, la misura della concentrazione dei soluti e della conducibilità elettrica forniscono un'informazione sul grado di danneggiamento delle membrane cellulari.

Metodo.

Si prelevano 100 mg di tallo lichenico che ripetutamente vengono "lavati" in acqua distillata per 3-5 secondi fino a stabilizzazione della conducibilità misurata, in modo tale da rimuovere eventuali contaminanti "esterni" al tallo recanti carica. Successivamente il tallo viene immerso in 50 mL di acqua distillata a conducibilità nota e viene posto sotto agitazione per 1 ora, al termine della quale si rimisura la conducibilità.

L'eventuale differenza va attribuita al rilascio di elettroliti dalla lacinia in misura proporzionale al danneggiamento delle membrane cellulari.

Si fanno poi bollire i talli per 10 minuti per causare la rottura totale delle membrane cellulari e dopo raffreddamento si misura nuovamente la conducibilità, i cui valori sono indicativi del massimo livello di danno possibile.

Si esprime il risultato finale come conducibilità relativa (EC%), data dal rapporto percentuale tra la conducibilità dopo un'ora di immersione e quella dopo la bollitura, avendo cura di sottrarre la conducibilità iniziale dell'acqua deionizzata.

Le misure di conducibilità sono state effettuate utilizzando la sonda Eutech Instruments Thermo Fischer Scientific.

2.4.1.3 Perossidazione dei lipidi di membrana dei talli lichenici

Le specie reattive dell'ossigeno, che sono generate in presenza di stress ossidativi, se non detossificate, possono portare alla perossidazione delle membrane biologiche, tra cui i lipidi di membrana.

Il test TBA RS (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*) è un saggio in grado di valutare il danneggiamento delle membrane cellulari ed il contenuto di malondialdeide (MDA) che si forma con la perossidazione dei lipidi (González & Pignata, 1994; Vavilin *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2005).

Contenuti maggiori di MDA sono stati osservati in campioni lichenici esposti in ambienti particolarmente inquinati (González & Pignata, 1997a).

Metodo.

Si sciacquano 50 mg di lacinia in acqua distillata, eliminando poi l'acqua tramite asciugatura con carta bibula.

La lacinia viene omogeneizzata con Ultraturrax[®] in 2,5 mL di acido tricloroacetico allo 0,1%. Si prelevano 1,5 mL di omogenato e si centrifugano a 12000 g per 20 minuti. Al termine si recuperano 0,5 mL di sovrantante, ad essi si aggiungono 1,5 mL di una

soluzione contenente acido 2,*tio* - barbiturico 0,6% in acido tricloroacetico al 10% ed il tutto viene posto in stufa a 95°C per 30 minuti.

Al termine dell'incubazione la miscela viene raffreddata e centrifugata a 12000 g per 10 minuti e si misura l'assorbanza del sovrinatante a 532 nm, correggendola per l'assorbimento aspecifico a 600 nm, utilizzando uno spettrofotometro UV - visibile (Perkin Elmer Lambda 4).

Si calcola la concentrazione delle sostanze reattive all'acido 2,*tio* - barbiturico (TBA RS) utilizzando il coefficiente di estinzione molare per il complesso TBA - MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ed esprimendo i risultati in $\mu\text{mol/g}$ (peso secco, p.s.) (Kwon *et al.*, 1965).

2.4.1.4 Pigmenti fotosintetici e degradazione della clorofilla

Nei licheni lo spettro di assorbimento della clorofilla risulta modificato in campioni trattati con metalli, con deviazioni rispetto ai controlli che dipendono dalla durata e dal tipo di trattamento (Puckett, 1976; Garty *et al.*, 1992).

L'azione dei metalli può comportare direttamente la degradazione della clorofilla e la sua conversione in feofitina (Garty *et al.*, 1988) o l'alterazione della sua sintesi.

Metodo.

Per evitare che alcune sostanze licheniche possano danneggiare la clorofilla durante il processo di estrazione, causando feofitizzazione (Brown & Hooker, 1977), è necessario provvedere alla loro rimozione dai talli eseguendo sei lavaggi di 5 minuti ciascuno con 3 mL di acetone tamponato con CaCO_3 e filtrato (Culberson & Kristinsson, 1970; Silberstein & Galun, 1988).

La presenza di acidi lichenici nei reflui di lavaggio viene controllata aggiungendo ad essi alcune gocce di KOH, verificando il viraggio di colore della soluzione da trasparente a gialla.

Alla fine del trattamento i campioni sono lasciati ad asciugare sotto cappa per circa mezz'ora per permettere all'acetone di evaporare completamente.

Per ogni campione si pesano 3 sottocampioni da 20 mg, costituiti ognuno da un'unica lacinia e conservati per 24 ore in essiccatore per stabilizzarne il peso.

L'estrazione dei pigmenti fotosintetici è effettuata secondo il protocollo proposto da Ronen & Galun (1984).

Per evitare il danneggiamento dei pigmenti fotosintetici, il procedimento di estrazione è effettuato con debole illuminazione verde.

I campioni sono poi introdotti in provette in vetro da 50 mL in cui sono stati posti 3 mg di polivinil - polipirrolidone (PVPP) e 3 mL di dimetilsolfossido, agente elettivo per l'estrazione cellulare dei pigmenti (Barnes *et al.*, 1992).

Dopo omogeneizzazione con Ultraturrax[®] (1,5 minuti), i campioni sono trasferiti in provette di HDPE a cui sono aggiunti 2 mL di dimetilsolfossido utilizzati per il risciacquo della testa dell'Ultraturrax[®] e 2 mL di dimetilsolfossido utilizzati per il risciacquo della provetta di vetro.

Le provette sono poi conservate al buio, a temperatura ambiente, per circa 18 ore, dopo le quali sono centrifugate per 10 minuti a 4000 rpm.

Il sovrnatante è raccolto in una provetta ed al precipitato si aggiungono 3 mL di dimetilsolfossido. Entrambi sono conservati al buio per 6 ore, al termine delle quali, dopo centrifugazione dei 3 mL di estratto, il sovrnatante è riunito con quello della precedente estrazione ed i 10 mL finali sono nuovamente centrifugati per far precipitare l'eventuale particolato in sospensione.

L'analisi è effettuata con uno spettrofotometro UV - visibile (Perkin Elmer Lambda 4), alle lunghezze d'onda di 665, 649 e 480 nm.

La torbidità delle soluzioni è controllata a 750 nm, verificando di mantenere valori di assorbanza inferiori a 0,01 unità.

Il contenuto di clorofilla a (C_a), di clorofilla b (C_b) e carotenoidi (xantofille + β carotene, C_{x+c}) è calcolato seguendo le equazioni di Wellburn (1994):

$$C_a = (12,19 * A_{665}) - (3,45 * A_{649})$$

$$C_b = (21,99 * A_{649}) - (5,32 * A_{665})$$

$$C_{x+c} = \frac{\{(1000 * A_{480}) - [(2,14 * C_a) - (70,16 * C_b)]\}}{220}$$

Per esprimere la degradazione della clorofilla a si è calcolato il quoziente di feofitinizzazione, dato dal rapporto tra i valori di assorbanza alle lunghezze d'onda di 435 e 415 nm (A_{435}/A_{415}), come indicato da Ronen & Galun (1984).

Molti studi hanno utilizzato tale rapporto per valutare il grado di degradazione della clorofilla a feofitina indotto da inquinamento aerodiffuso (Garty *et al.*, 2000; Tretiach *et al.*, 2007).

2.4.1.5 Efficienza fotosintetica

La fluorescenza clorofilliana è un buon metodo per analizzare cambiamenti a carico dell'apparato fotosintetico.

Esistono studi che analizzano il comportamento della fluorescenza nei licheni in relazione alla temperatura (Schroeter, 1994), allo stato di idratazione (Calatayud *et al.*, 1997), agli inquinanti (Branquinho *et al.*, 1997).

Metodo.

L'efficienza fotosintetica del PSII viene spesso espressa attraverso il parametro F_v/F_m , dove F_m indica il valore di fluorescenza massima ottenuta dopo l'applicazione di un flash di luce saturante ad un campione adattato al buio (*dark - adapted*) e F_v la differenza tra F_m e F_0 , dove F_0 è il livello minimo di fluorescenza che è emessa dal campione adattato al buio prima di applicare il flash di luce saturante.

I campioni sono idratati e fatti adattare alla nuova condizione per un'ora. Successivamente si pongono delle clips su parti scelte di tallo per 10 minuti in modo da adattare i campioni al buio (Fig. 2.14).



Figura 2.14 – Clips utilizzate per adattare i campioni al buio.

Al termine dei 10 minuti si misura la fluorescenza con un *plant efficiency analyzer* (Handy PEA, Hansatech Instruments) (Fig. 2.15), dopo esposizione a flash di luce saturante di $2400 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ per la durata di 1 secondo.



Figura 2.15 – Fluorimetro Handy PEA.

2.4.2 Analisi dei filtri dei campionatori passivi

2.4.2.1 Ossidi di azoto

Il principio su cui si basa la determinazione degli ossidi di azoto è la cattura del biossido e dell'ossido di azoto su una superficie reattiva dopo aver trasformato l'ossido di azoto in biossido per ossidazione.

La specie analizzata è il nitrito, risultante dalla somma delle due specie. Dalla quantità di nitrito determinato si risale alla concentrazione degli ossidi di azoto in aria. Si determina il nitrito in soluzione mediante cromatografia ionica.

La soluzione estraente è l'eluente utilizzato per il cromatografo ionico Dionex con colonna per anioni AS12A, ovvero una soluzione 8 mM di Na_2CO_3 e 1 mM di NaHCO_3 . L'estrazione avviene introducendo il filtro in un contenitore recante 5 mL della soluzione sodio carbonato - bicarbonato e sottoponendolo ad agitazione per un'ora.

Al termine si esegue l'analisi cromatografica ed il nitrito viene espresso in mg/L. Risultando noto il volume estraente si può ricavare la quantità assoluta di nitrito presente sul filtro e, sottraendo a questa quella relativa al bianco (filtro posizionato in campo tenuto chiuso), si calcola la concentrazione "media oraria" degli NO_x , secondo la Direttiva Europea 1999/30, relativamente al periodo di esposizione del filtro applicando la seguente formula:

$$\text{NO}_x = 2,89 * 10^3 \frac{W}{t}$$

dove:

W = quantità di nitrito (μg) catturata sul filtro esposto (detratto il bianco) e determinata sulla base della curva di calibrazione degli standard;

t = tempo di esposizione in ore.

Il calcolo assume una temperatura media di campionamento pari a 20°C.

Per valori sensibilmente diversi (e.g. vicino a 5-10°C o superiori a 30°C) si può tenere conto della variazione del coefficiente di diffusione moltiplicando per il fattore:

$$\left(\frac{293}{273 + T} \right)^{1.8}$$

dove:

T = temperatura media durante il campionamento in °C.

2.4.2.2 Biossido di zolfo

Il principio su cui è basata la determinazione del biossido di zolfo è la cattura di questo su una superficie reattiva e l'analisi del solfato risultante. Dalla quantità di solfato determinato sulla superficie assorbente si risale alla concentrazione di biossido di zolfo in aria. Il biossido di zolfo viene catturato come solfito che, essenzialmente ad opera dell'ozono atmosferico, viene trasformato non quantitativamente in solfato durante il campionamento. Si usa acqua ossigenata nella soluzione estraente allo scopo di trasformare lo zolfo IV in zolfo VI quantitativamente. Si determina il solfato in soluzione tramite cromatografia ionica e dal solfato si risale alla concentrazione del biossido di zolfo in aria. La soluzione estraente è costituita da acqua ossigenata in una soluzione di carbonato/bicarbonato di sodio (8 mM di Na_2CO_3 e 1 mM di NaHCO_3) alla cui azione il filtro è esposto, sotto agitazione, per un'ora. Anche in tal caso il solfato è espresso in mg/L e successivamente come quantità assoluta in base al volume di soluzione estraente.

Il calcolo della concentrazione di SO_2 in aria (espressa come valore medio orario in $\mu\text{g}/\text{m}^3$) viene effettuato in accordo con la seguente equazione:

$$\text{SO}_2 = 1,32 * 10^3 \frac{W}{t}$$

dove:

W = quantità di solfato (μg) catturata sul filtro esposto (detratto il bianco) e determinata grazie alla curva di calibrazione degli standard;

t = tempo di esposizione in ore.

Il calcolo assume una temperatura media di campionamento pari a 20°C. Per valori sensibilmente diversi (e.g. vicino a 5-10°C o superiori a 30°C) si può tenere conto della variazione del coefficiente di diffusione moltiplicando per il fattore:

$$\left(\frac{293}{273 + T}\right)^{1,8}$$

dove:

T = temperatura media durante il campionamento in °C.

2.4.2.3 Ozono

Il principio su cui si basa la determinazione dell'ozono è l'ossidazione del nitrito ad opera dell'ozono per dare nitrato. La superficie reattiva è infatti a base di nitrito che reagisce con l'ozono per dare nitrato. Dalla quantità di nitrato si risale alla concentrazione di ozono. Come per gli altri analiti, il nitrato è rimosso dal filtro dopo immersione in 5 mL di una soluzione 8 mM di Na₂CO₃ e 1 mM di NaHCO₃, agitazione per un'ora e successiva analisi cromatografica (colonna AS12A).

Il risultato dell'analisi in cromatografia ionica è espresso in mg/L di anione nitrato e, in base al volume estraente, in quantità assoluta di nitrato.

Sottraendo il valore del bianco si ottiene la concentrazione media oraria in µg/m³ dell'ozono in base alla formula:

$$O_3 = 2,65 * 10^3 \frac{W}{t}$$

dove:

W = quantità di nitrato (µg) catturata sul filtro esposto (detratto il bianco) e determinata grazie alla curva di calibrazione degli standard;

t = tempo di esposizione in ore.

Il calcolo assume una temperatura media di campionamento pari a 20°C.

Per valori sensibilmente diversi (e.g. vicino a 5-10°C o superiori a 30°C) si può tenere conto della variazione del coefficiente di diffusione moltiplicando per il fattore:

$$\left(\frac{293}{273 + T}\right)^{1,8}$$

dove:

T = temperatura media durante il campionamento in °C.

2.4.2.4 Ammoniaca

L'ammoniaca atmosferica reagisce, in fase acquosa, formando ione ammonio. Lo ione ammonio, che viene intercettato dal filtro, tende a degradare nel tempo.

Di conseguenza i campioni da analizzare devono essere conservati in frigorifero a 4°C e se possibile, in via precauzionale, in freezer a -10°C o a temperatura più bassa. L'ammonio viene rimosso dal filtro dopo agitazione per un'ora in 5 mL di acqua deionizzata e successivamente se ne determina la concentrazione in mg/L dopo corsa cromatografica (colonna CS12, eluente: acido metansulfonico 20 mM).

La quantità totale di ammonio su filtro viene ricavata in base al volume di estrazione e la concentrazione media oraria ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) di NH_3 viene calcolata in base alla seguente equazione:

$$\text{NH}_3 = 9,06 * 10^2 \frac{W}{t}$$

dove:

W = quantità di ammonio (μg) catturata sul filtro esposto (detratto il bianco) e determinata grazie alla curva di calibrazione degli standard;

t = tempo di esposizione in ore.

Il calcolo assume una temperatura media di campionamento pari a 20°C.

Per valori sensibilmente diversi (e.g. vicino a 5-10°C o superiori a 30°C) si può tenere conto della variazione del coefficiente di diffusione moltiplicando per il fattore:

$$\left(\frac{293}{273 + T} \right)^{1,8}$$

dove:

T = temperatura media durante il campionamento in °C.

2.4.3 Determinazione degli elementi in traccia ed ultratraccia nei Licheni

La procedura consiste nel prelievo, dopo polverizzazione in azoto liquido, di un'aliquota pari a circa 0,5 g del preparato di lichene, alla quale viene aggiunta una miscela di reagenti ultrapuri costituita da 6 mL di HNO_3 al 70%, 0,2 mL di HF al 60% ed 1 mL di H_2O_2 al 30%.

L'attacco acido è condotto in contenitori cilindrici di teflon, per 30 minuti, utilizzando il digestore a microonde ETHOS 900 della Milestone.

In ogni ciclo si mineralizza, con le stesse modalità, anche uno standard analitico certificato di riferimento (BCR 482 "Lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf",

certificata dall'IRMM, *Institute for Reference Materials and Measurements*, Geel - Belgium) ed un *blank*, costituito dai reagenti utilizzati per la solubilizzazione, allo scopo di quantificare l'influenza sulla concentrazione degli elementi chimici da parte dei contenitori in teflon e/o dei reagenti.

L'analisi è stata effettuata mediante ICP-MS 7005 CE Agilent Technologies.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Richieste ecologiche del lichene *Pseudevernia furfuracea*

Il lichene *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf è una specie meso - xerofitica che colonizza prevalentemente gli ambienti collinari e montuosi (soprattutto al di sopra dei 1000 m s.l.m.) ed eccezionalmente è presente in pianura.

Predilige valori, in media, bassi di temperatura ed elevati di umidità, come pure un'esposizione indiretta alla radiazione solare e risulta non molto tollerante a condizioni di eutrofizzazione atmosferica (Miani *et al.*, 2006).

I talli utilizzati per l'attività di monitoraggio sono stati prelevati dalla località La Fossia in Sila (CS) e trapiantati in un'area sita tra i comuni di Castrovillari, Frascineto ed Eianina. Come si può evidenziare dai grafici sottostanti (Figg. 3.1 e 3.2), le due zone sono alquanto differenti in termini di caratteristiche climatiche.

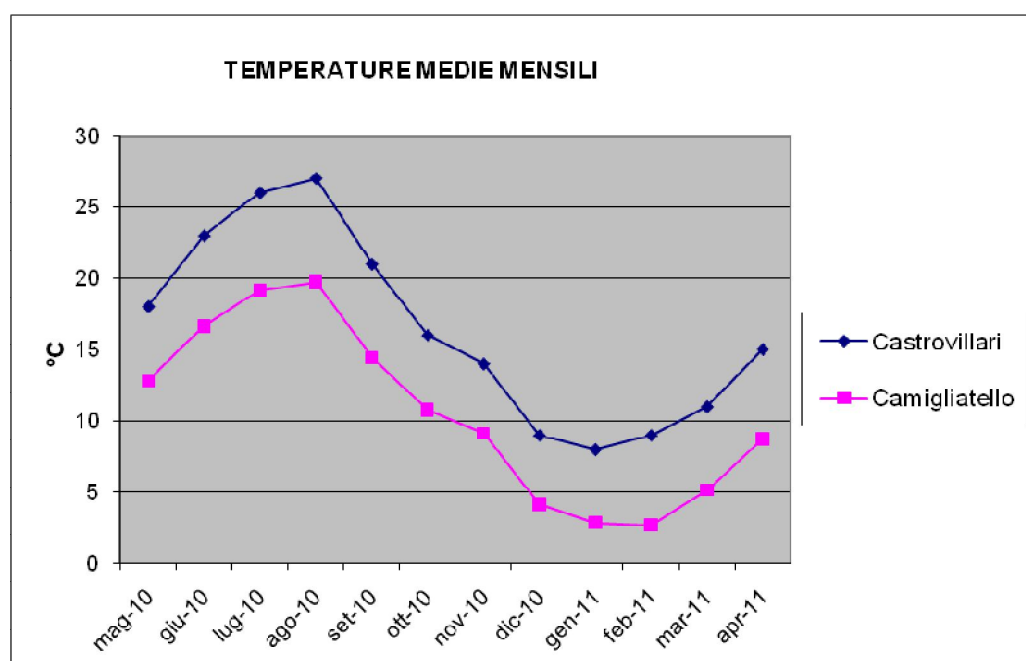


Figura 3.1 – Temperature medie mensili registrate in prossimità dei centri di Camigliatello e di Castrovillari.

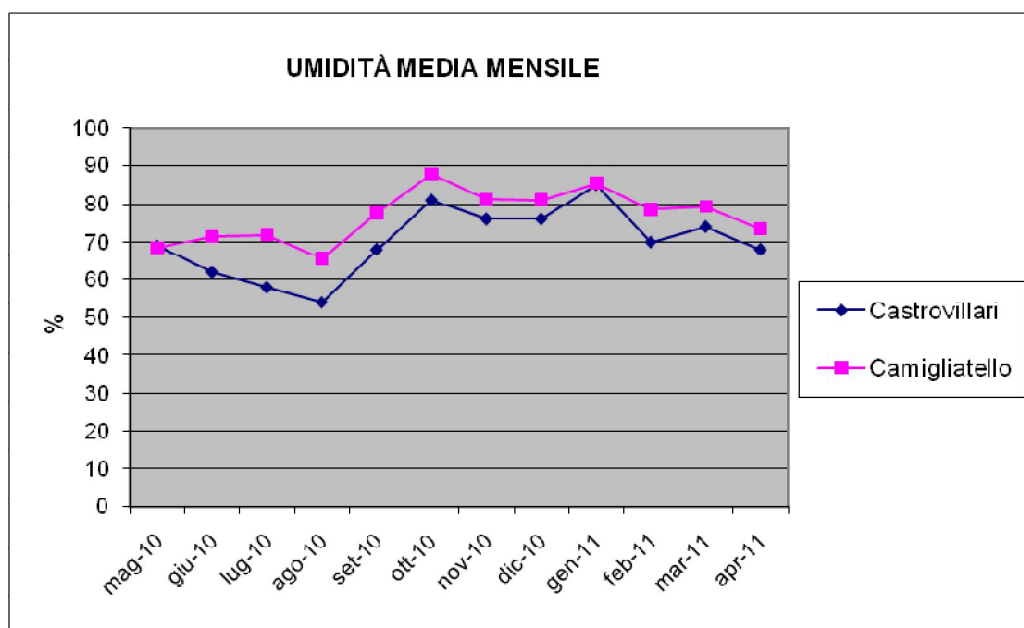


Figura 3.2 – Umidità media mensile registrata in prossimità dei centri di Camigliatello e di Castrovillari.

È possibile rilevare che lo scarto maggiore tra le due aree si determina nel periodo estivo e quello minimo tra l'autunno e l'inverno. Inoltre il limite superiore di stress termico si attesta sui 20°C (Vannini *et al.*, 2011) suggerendo che tra maggio e settembre tale fattore risulta penalizzare lo stato di efficienza fisiologica di *Pseudevernia furfuracea* nell'area di Castrovillari, ove di fatto questa specie risulta naturalmente assente, e che tutte le valutazioni sui parametri ecofisiologici devono tenere conto dell'incidenza della variazione stagionale su di essi prima di andare a ricercare eventuali associazioni con la presenza di attività antropiche *in situ*.

3.2 Individuazione dei venti dominanti

Dal momento che l'attività di monitoraggio risulta finalizzata alla valutazione della qualità dell'aria nel distretto di indagine predefinito ed alla possibile incidenza delle sue variazioni sullo stato fisiologico dei talli lichenici ivi trapiantati, è risultato di primaria importanza individuare quale fosse la direzione di propagazione dei venti più frequente su base annua e stagionale dal momento che l'aria risulta il vettore di tutti gli inquinanti aerodispersi, determinandone le traiettorie di distribuzione e la ricaduta nel territorio.

I dati qui presentati risultano dall'elaborazione realizzata sul database, relativo agli anni 2004-2009, sui parametri meteorologici registrati dalla centralina gestita dall'impianto dell'ITALCEMENTI sito tra i comuni di Castrovillari, Frascineto ed Eianina.

L'accorpamento delle misurazioni relative alla direzione di provenienza del vento è stato eseguito in base ai trimestri di esposizione dei talli lichenici, così da avere una adeguata sovrapposizione tra le due serie di dati (Figg. 3.3 - 3.6).

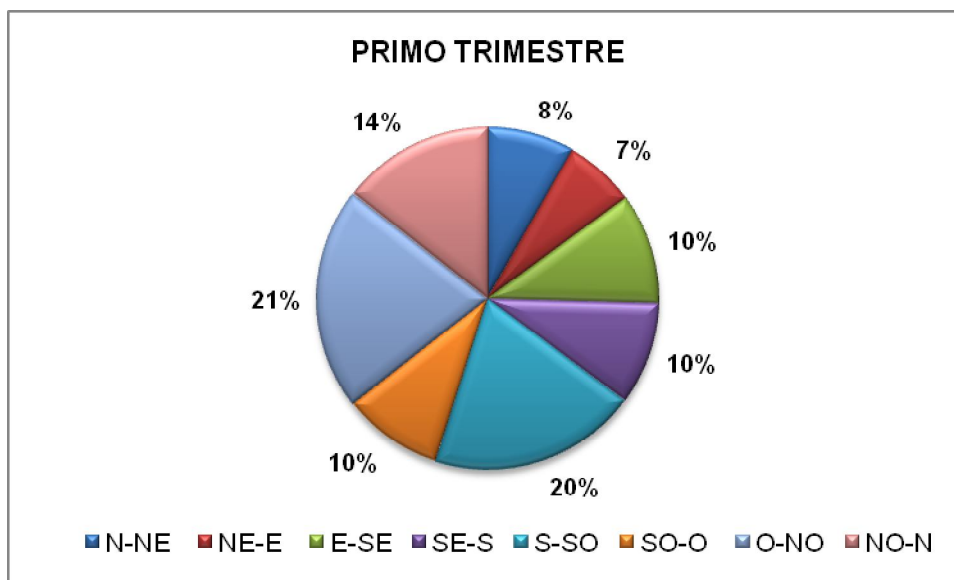


Figura 3.3 – Distribuzione percentuale della direzione di provenienza dei venti inerente al trimestre maggio 2010 - luglio 2010 (primo trimestre di esposizione dei talli lichenici).

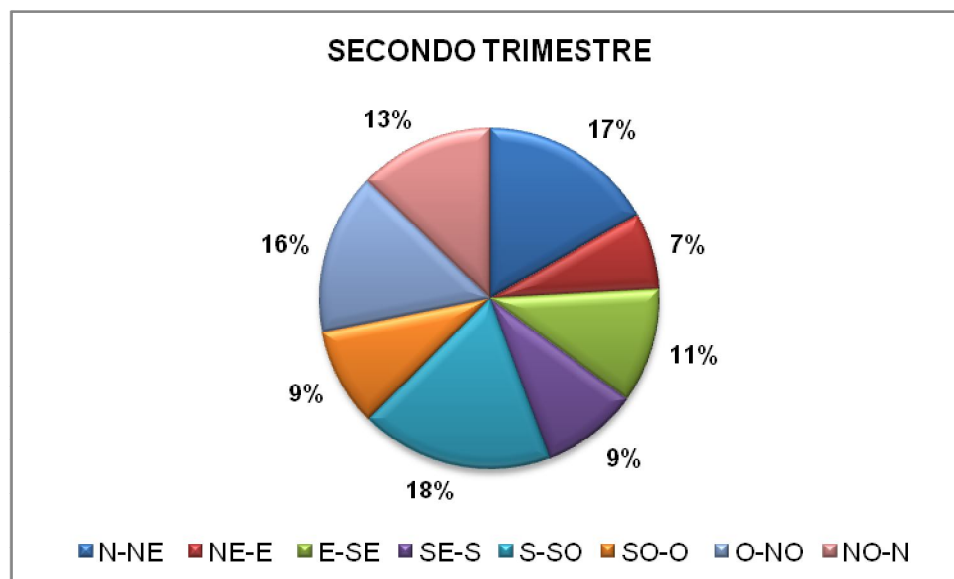


Figura 3.4 – Distribuzione percentuale della direzione di provenienza dei venti inerente al trimestre agosto 2010 – ottobre 2010 (secondo trimestre di esposizione dei talli lichenici).

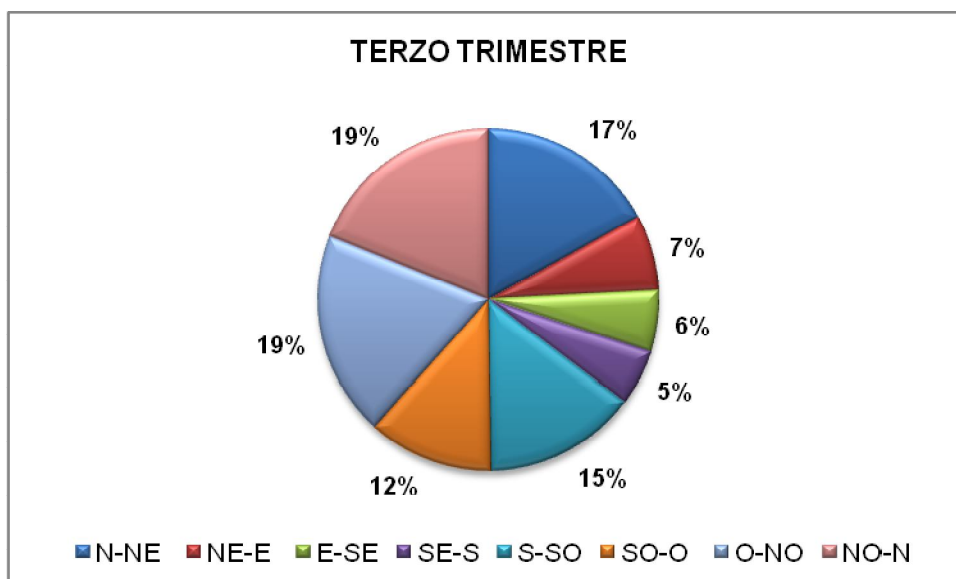


Figura 3.5 – Distribuzione percentuale della direzione di provenienza dei venti inerente al trimestre novembre 2010 – gennaio 2011 (terzo trimestre di esposizione dei talli lichenici).

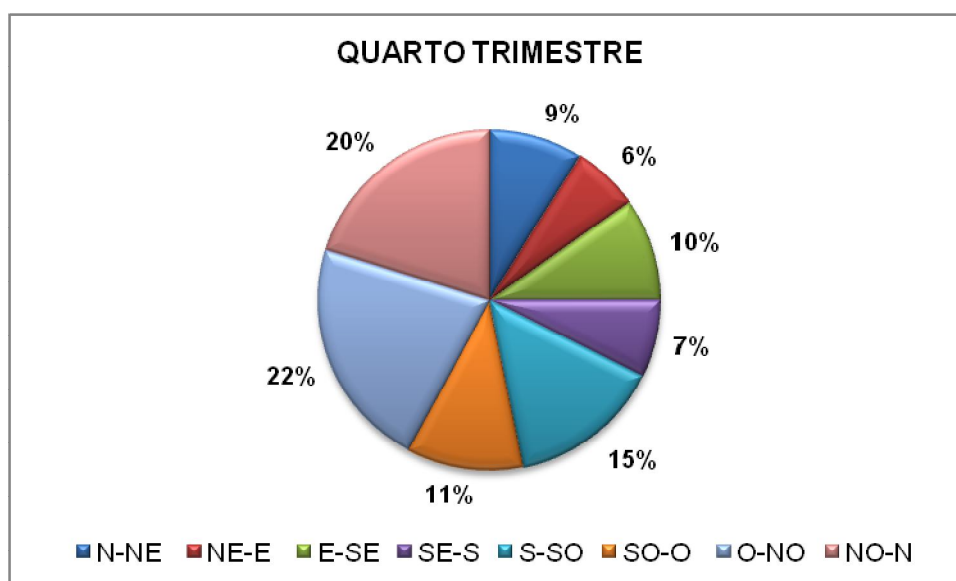


Figura 3.6 – Distribuzione percentuale della direzione di provenienza dei venti inerente al trimestre febbraio 2011 - aprile 2011 (quarto trimestre di esposizione dei talli lichenici).

Appare evidente che la componente ampiamente dominante è quella da ovest con una frequenza complessiva su base annua pari al 63,2% rispetto a quella da est che si attesta su di un valore ampiamente più basso (36,8%).

Inoltre nell'ambito della componente da ovest il quadrante dal quale i venti soffiano con maggiore frequenza è quello di N-O (36%) rispetto a quello di S-O (27%), il che suggerisce che il settore di S-E della presente area di monitoraggio è quello che con maggiore frequenza riceve l'ingresso di masse di aria in movimento.

Per quanto attiene all'andamento trimestralizzato si può verificare che la frequenza più elevata si riscontra nel periodo febbraio - aprile (43%) e quella più bassa nel periodo agosto - ottobre (28%).

Va notato, infine, che le frequenze di provenienza del vento dai quadranti di N-E e S-E risultano sostanzialmente equivalenti (19,6% e 17,1%), mentre nel caso dei trimestri si può evidenziare che il quadrante di N-E mostra i valori più elevati nei periodi agosto - ottobre e novembre - gennaio e quelli più bassi negli altri due periodi (maggio - luglio con il 14,9%; febbraio - aprile con il 15,2%), laddove il quadrante di S-E mostra le maggiori frequenze nei periodi maggio - luglio e agosto - ottobre (20%) e quelle minori tra novembre e gennaio (11%).

3.3 Valutazione della variazione delle componenti gassose dell'atmosfera nel periodo di esecuzione del monitoraggio biologico

Come indicato nel capitolo "Materiali e Metodi", la misurazione delle concentrazioni medie giornaliere mediante campionatori passivi è stata realizzata in un distretto di dimensioni più limitate rispetto all'intera area di esecuzione del biomonitoraggio, tale da delimitare una zona prossimale alla cemenzeria, ai centri di Frascineto ed Eianina e ad un segmento della bretella autostradale che interseca il distretto territoriale indagato.

Vengono riportati nelle figure 3.7 - 3.14 gli istogrammi relativi alla variazione della concentrazione media giornaliera delle componenti gassose valutata su base spaziale (espressa come media delle singole misurazioni mensili per stazione di monitoraggio) e su base temporale (espressa come media delle 10 stazioni di campionamento per singolo mese).

3.3.1 Ammoniaca (NH₃)

Le indicazioni derivanti dalla normativa europea (G.U.U.E., 2008) in merito alla protezione degli organismi vegetali a seguito di esposizione all'ammoniaca fissano un valore limite di 8 µg/m³ che risulta superato solo nel 10% di tutte le misurazioni

eseguite. Ciò suggerirebbe che le concentrazioni medie giornaliere di tale gas nel distretto monitorato (e presumibilmente nell'intera area di studio) non raggiungano livelli tossici (al più solo raramente), mentre è possibile che esse determinino un effetto eutrofizzante a carico dei talli esposti (Fрати *et al.*, 2010; Ra *et al.*, 2005).

Tuttavia recenti indicazioni di letteratura (Cape *et al.*, 2009; Paoli *et al.*, 2010a) suggeriscono che i livelli critici di ammoniaca, soprattutto nel caso di comunità formate da organismi sensibili (specie acidofile), possano essere fissati a valori più bassi, che si aggirano tra 1 e 4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, per cui le concentrazioni da noi rilevate nel periodo autunno - vernino andrebbero considerate con maggiore cautela, non escludendo un loro eventuale contributo allo sviluppo di stress fisiologico.

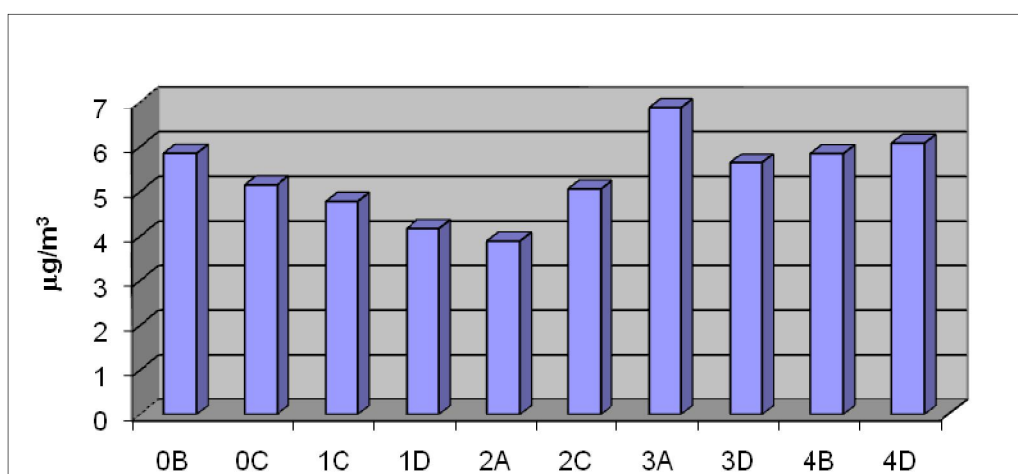


Figura 3.7 – Valore medio della concentrazione giornaliera di NH_3 determinato in ciascuna delle stazioni di monitoraggio.

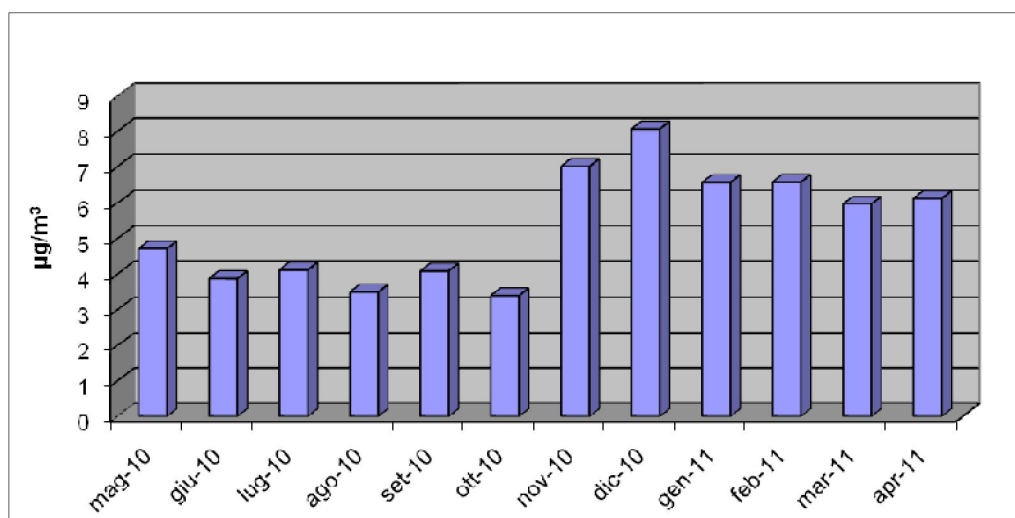


Figura 3.8 – Valore medio della concentrazione giornaliera di NH_3 per singolo mese.

Se si esamina la variazione spaziale dell'ammoniaca si può notare che le stazioni con i valori medi più elevati sono quelle più vicine alla fascia di agricoltura intensiva ed estensiva sita a sud-sud/est rispetto all'area sottoposta ad attività di monitoraggio.

Inoltre ampiamente prevalenti risultano la viticoltura e l'olivicoltura che richiedono intense fertilizzazioni azotate sia nel periodo primaverile che in quello autunno - vernino^[5,6] e la cerealicoltura per la quale le massime richieste di azoto si hanno nel periodo di semina e post - semina (autunno - inverno)^[7].

Tutto ciò suggerisce con una certa evidenza che le attività agricole ivi presenti siano in grado di esercitare una sensibile influenza sull'oscillazione spaziale e temporale delle concentrazioni di ammoniaca in atmosfera.

3.3.2 Ossidi di azoto (NO_x)

Anche nel caso degli NO_x i livelli di concentrazione riscontrati non sembrano destare particolare preoccupazione se riferiti agli standard europei di qualità dell'aria (G.U.U.E., 2008).

Va comunque messo in evidenza che rispettivamente nel 6% e 16% delle misurazioni complessive si ha il superamento delle soglie critiche per la tutela della salute dell'uomo e per quella delle componenti vegetali.

Nel caso dei licheni, i valori in corrispondenza dei quali gli NO_x manifestano effetti fitotossici sembrano attestarsi intorno ai 70 µg/m³ (Marmor & Randlane, 2007), sebbene altri studi riferiscano di una riduzione dell'abbondanza dei licheni epifiti a concentrazione di NO₂ a partire da 40 µg/m³ (Cepeda Fuentes & Garcia Rove, 1998).

Si tratta di valori abbastanza lontani da quelli misurati nell'area monitorata, tuttavia non è da escludere, anche alla luce dei picchi mensili riscontrati, che tali livelli possano invece avere un effetto "fertilizzante" su di un lichene acidofilo quale *Pseudevernia furfuracea* (Fрати *et al.*, 2006).

In ogni caso tale eventuale stimolazione sarebbe limitata al perimetro autostradale in quanto è facilmente evidenziabile che i valori più alti risultano associati proprio alle stazioni prossime al tracciato della A3 e l'abbattimento delle concentrazioni di tale gas si determina nell'ordine di qualche centinaio di metri dalla sede stradale (Roorda-Knape *et al.*, 1998). Ulteriore conferma della prevalente influenza sui livelli di NO_x del traffico autoveicolare viene dal picco che si riscontra tra luglio ed agosto in corrispondenza della massima densità di veicoli associata ai flussi turistici più elevati.

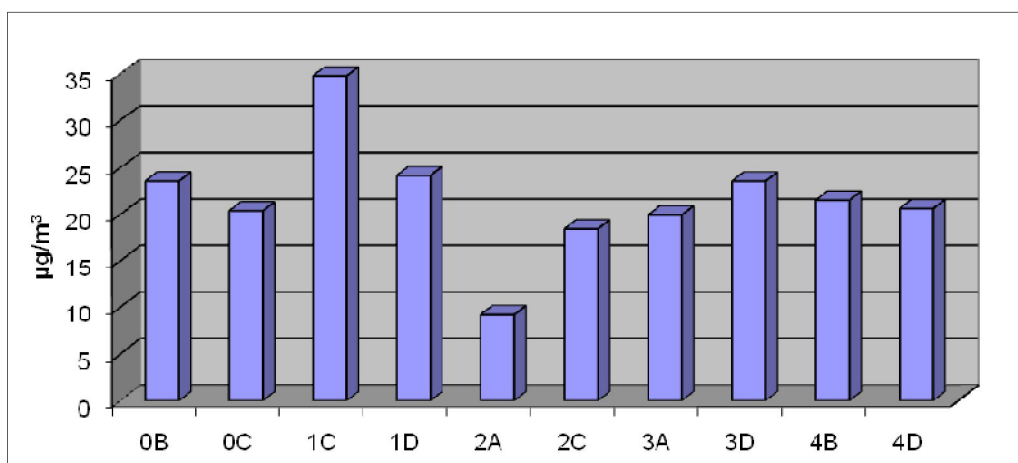


Figura 3.9 – Valore medio della concentrazione giornaliera di NO_x determinato in ciascuna delle stazioni di monitoraggio.

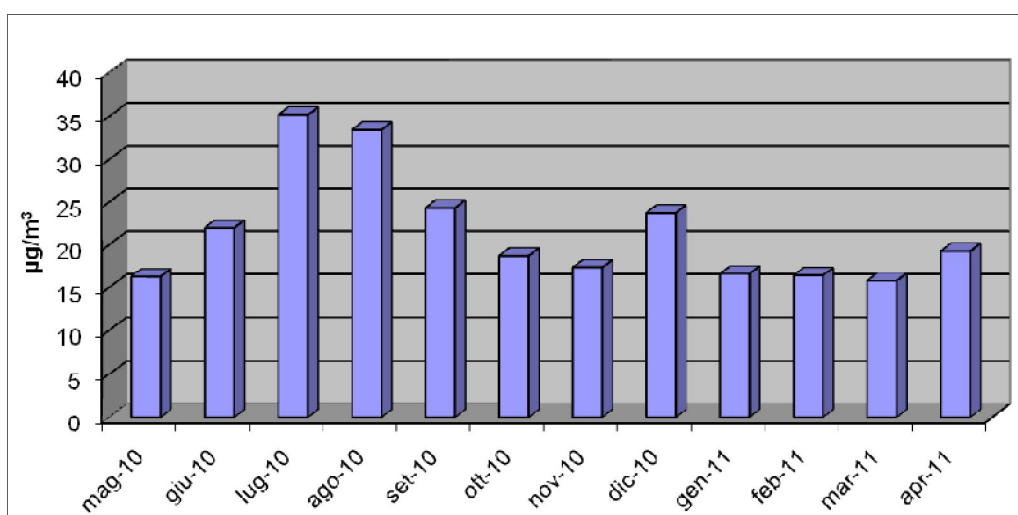


Figura 3.10 – Valore medio della concentrazione giornaliera di NO_x per singolo mese.

3.3.3 Ozono (O₃)

L'ozono si mantiene sempre ben al di sotto dei limiti legislativi definiti a tutela della salute umana e della vegetazione (G.U.U.E., 2008).

Per quanto attiene il relativo andamento temporale esso sembra debolmente associarsi a quello degli NO_x e ciò sembra essere in accordo a quanto noto dalla letteratura^[8], per cui, l'interazione degli ossidi di azoto con l'ossigeno, catalizzata dalla componente ultravioletta della radiazione solare, incide sulla variazione di concentrazione atmosferica dell'ozono.

Va sottolineato, inoltre, che siccome la cinetica di formazione di tale gas non è estremamente rapida, è possibile che lo sviluppo di picchi si abbia anche ad una certa distanza dalla sorgente di NO_x o di altre sostanze che ne promuovono la sintesi, per cui risulta difficile tracciare spazialmente le sorgenti nell'aria di studio, o più o meno prossime ad essa, che possano avere contribuito alla variazione delle concentrazioni di O₃.

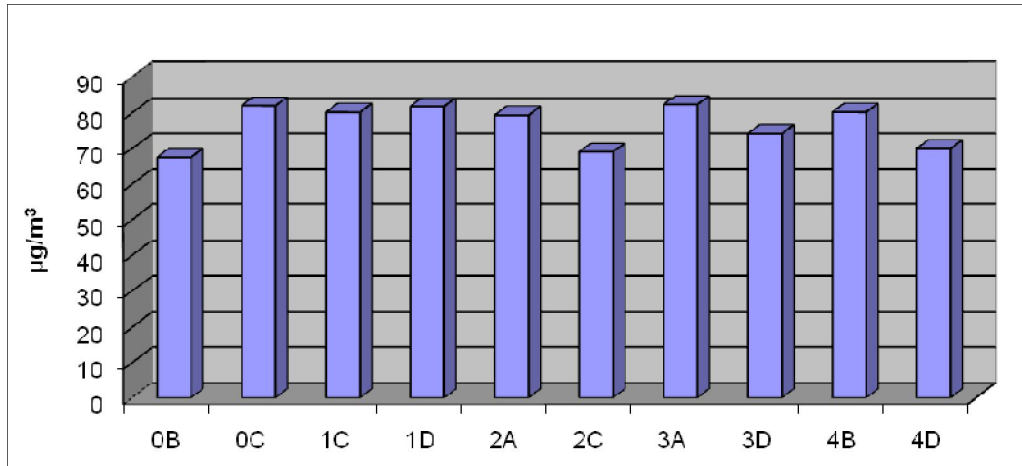


Figura 3.11 - Valore medio della concentrazione giornaliera di O₃ determinato in ciascuna delle stazioni di monitoraggio.

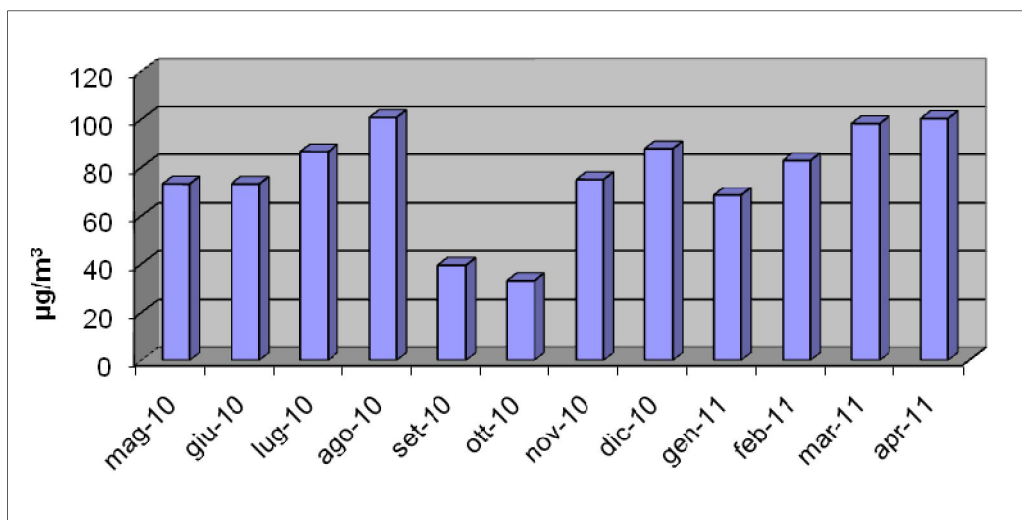


Figura 3.12 – Valore medio della concentrazione giornaliera di O₃ per singolo mese.

3.3.4 Anidride solforosa (SO₂)

Analogamente all'ozono anche le concentrazioni di anidride solforosa non si approssimano mai a valori che possano rappresentare un fattore di stress per l'uomo o le altre componenti biologiche ecosistemiche (G.U.U.E., 2008), compresi licheni epifiti (Hawksworth & Rose, 1970).

I valori più alti riscontrati in prossimità della sede autostradale, come pure in corrispondenza della prima parte dell'estate (esodo turistico), suggeriscono che il traffico veicolare possa costituire un fattore prevalente nell'influenzare la variazione spazio - temporale di tale gas.

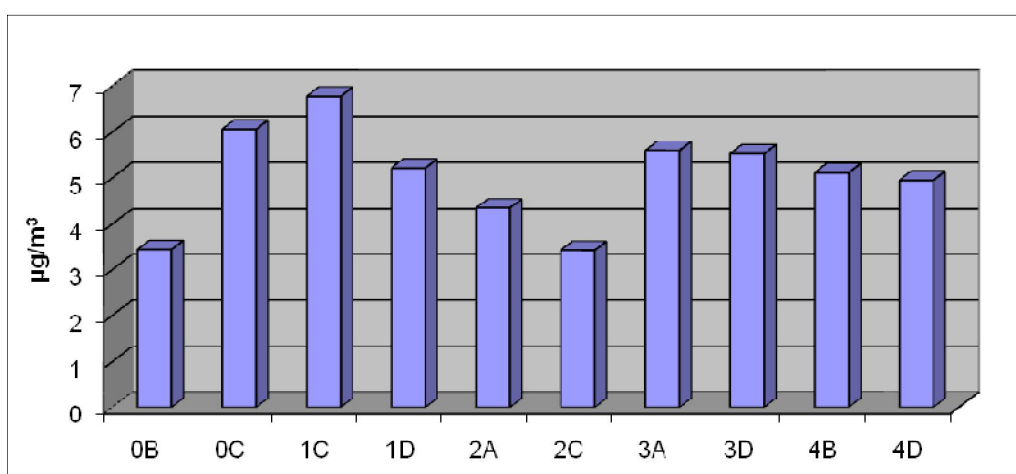


Figura 3.13 – Valore medio della concentrazione giornaliera di SO₂ determinato in ciascuna delle stazioni di monitoraggio.

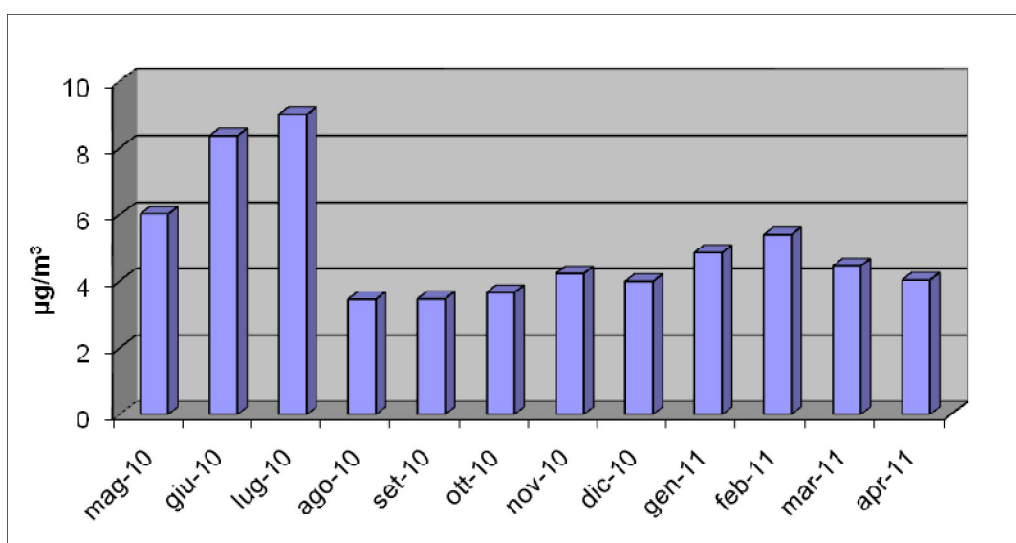


Figura 3.14 – Valore medio della concentrazione giornaliera di SO₂ per singolo mese.

3.4 Premessa all'analisi dei risultati dei trapianti di *Pseudevernia furfuracea*

I talli trapiantati nel secondo trapianto (agosto 2010 - ottobre 2010) hanno mostrato lo sviluppo di una macroscopica colonizzazione biologica da parte di una notevole varietà di organismi (gasteropodi, acari, pseudoscorpioni, muffe *etc.*), i quali li hanno utilizzati come nicchia spaziale e trofica (Figg. 3.15 a, b).

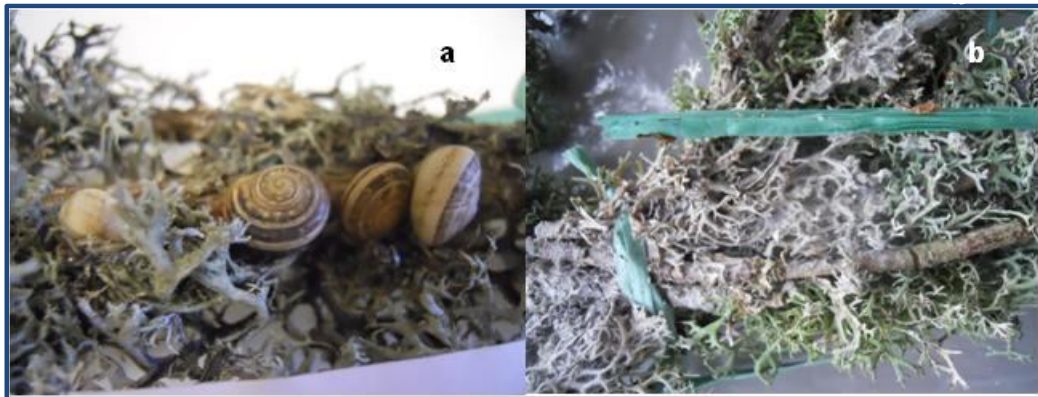


Figura 3.15 – Talli lichenici colonizzati (a) e deteriorati in campo per la presenza di ragnatele e la formazione di muffe (b).

Dopo aver recuperato i talli la microfauna è stata rimossa e l'osservazione del tessuto lichenico rivelava la presenza di palesi segni di alterazione morfologica.

La successiva esecuzione dei saggi per la valutazione dei parametri ecofisiologici ha prodotto dei valori di un ordine di grandezza 4 volte superiore od inferiore a quelli del precedente trimestre, un risultato difficilmente associabile alle condizioni climatiche, vista la loro sostanziale paragonabilità con quelle del periodo maggio - luglio.

Anche volendo ipotizzare un eventuale contributo di sostanze inquinanti alla variazione dei parametri ecofisiologici, è apparso innegabile l'effetto esercitato su di essa dalla colonizzazione biologica e, essendo i due fenomeni inscindibili, il risultato è stato ritenuto non interpretabile e quindi non utilizzabile per le finalità delle attività di monitoraggio della qualità dell'aria.

3.5 Valutazione del trend temporale dell'accumulo di metalli pesanti e dei parametri ecofisiologici nel lichene *Pseudevernia furfuracea* durante il periodo di monitoraggio (maggio 2010 - aprile 2011)

È noto che la capacità da parte dei licheni di assumere metalli associati alle microparticelle atmosferiche dipende da una serie di fattori:

- le caratteristiche intrinseche della specie ovvero: il rapporto superficie esposta/massa totale (Nash III & Sommerfeld, 1981); la capacità di secernere negli spazi intracellulari acidi organici a basso peso molecolare (Chislom *et al.*, 1987; Pawlik-Skowrońska, 2006), benzofurani, depsidi e depsidoni (Fahselt, 1994) che formano precipitati con i metalli; la presenza di gruppi polianionici associati alla parete cellulare, consistenti in funzioni carbossiliche ed idrocarbossiliche (Nieboer *et al.*, 1976), come pure amminiche ed idrossiliche (Bačkor & Loppi, 2009); l'assorbimento degli elementi all'interno del citosol, un processo mediato da *carriers* che necessita consumo energetico (Farrar, 1976); la valenza ambientale rispetto alle escursioni dei fattori limitanti;
- la variazione soprattutto di temperatura e di disponibilità di acqua (umidità e livello di precipitazioni), sebbene i licheni siano dei classici organismi stress - tolleranti, primariamente in base a meccanismi "costitutivi" che impongono ad essi un costo energetico elevato con un conseguente sensibile rallentamento del tasso di crescita (Beckett *et al.*, 2002);
- le concentrazioni atmosferiche di metalli dipendenti dalla dimensione degli input, quelli edafici, in funzione delle caratteristiche geologiche del territorio e quelli antropici, in funzione della natura, della dimensione e della diffusione delle attività umane (Schleicher *et al.*, 2010). Ovviamente l'intensità e la direzione del vento concorrono a loro volta a determinare le traiettorie di deposizione delle particelle vettori dei metalli e l'areale di deposizione, mentre la frequenza e l'intensità delle precipitazioni meteoriche determina la dimensione del flusso dei metalli sul territorio in termini di *wet* e *dry depositions*.

I primi due fattori risultano particolarmente critici laddove si opti per la scelta di trapianti lichenici ai fini del monitoraggio delle caratteristiche dell'aria in una zona di interesse, mentre il terzo appare cruciale per la definizione di un disegno sperimentale che risulti il più efficace possibile nel rilevare eventuali processi di contaminazione atmosferica su scala locale.

Nella figura 3.16 viene mostrato il numero di stazioni in cui i talli risultano accumulare metalli nel periodo di esposizione, rispetto a quelli che erano i livelli di

elementi nell'area sorgente (Fрати *et al.*, 2005), mentre nelle figure 3.17 - 3.21 vengono riportati, per singolo metallo, i valori di concentrazione misurati nei talli esposti di *Pseudevernia furfuracea*. La concentrazione viene espressa come mediana in quanto, per alcuni metalli, i valori misurati in alcune stazioni risultavano essere palesemente degli *outliers* (in termini di elevata devianza tanto negativa quanto positiva), che avrebbero inficiato il livello di rispondenza del valore di tendenza centrale rispetto alle classi di valori più frequentemente rappresentate (in Allegato I sono mostrati i *boxplots* con i relativi quartili).

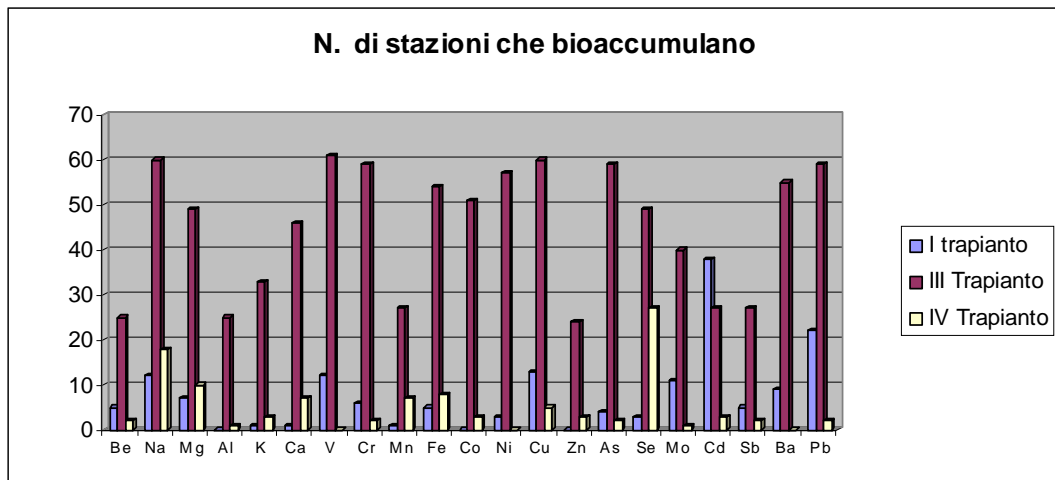


Figura 3.16 – Numero di stazioni nelle quali i trapianti lichenici mostrano un valore del rapporto E/C (*exposed to control ratio*) denotante accumulo di metalli (> 1,25) (Fрати *et al.*, 2005).

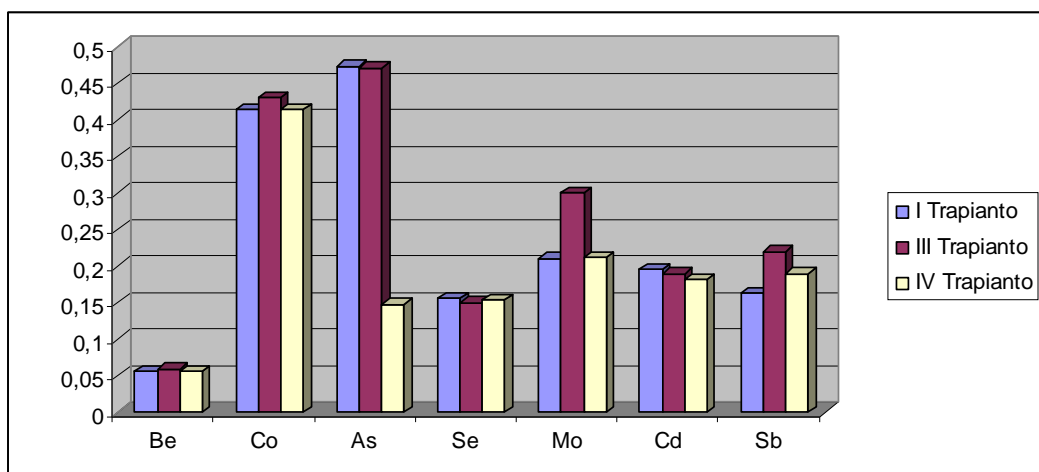


Figura 3.17 – Mediana della concentrazione dei metalli pesanti all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

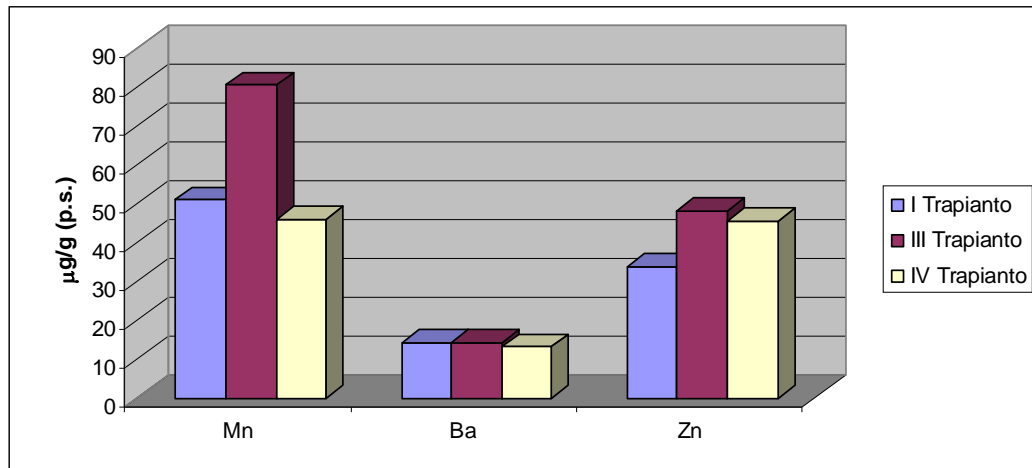


Figura 3.18 – Mediana della concentrazione dei metalli pesanti all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

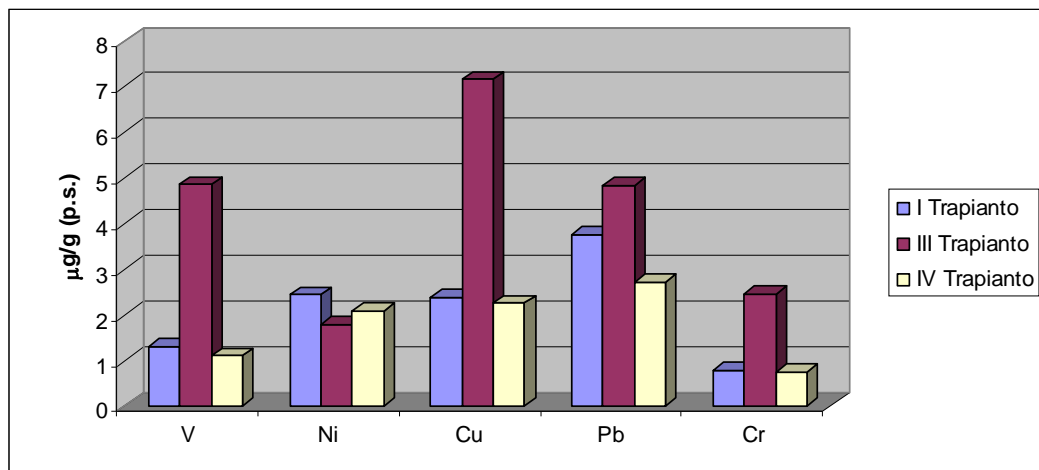


Figura 3.19 – Mediana della concentrazione dei metalli pesanti all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

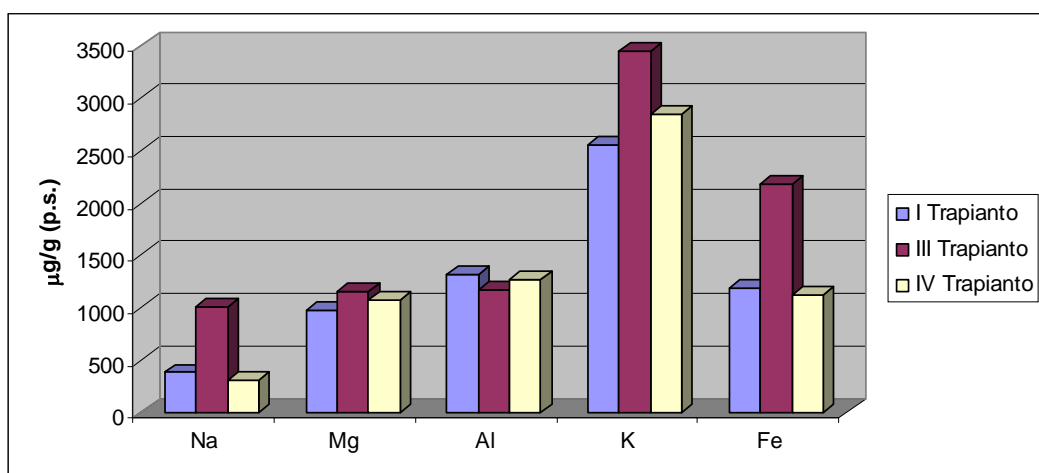


Figura 3.20 – Mediana della concentrazione dei metalli pesanti all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

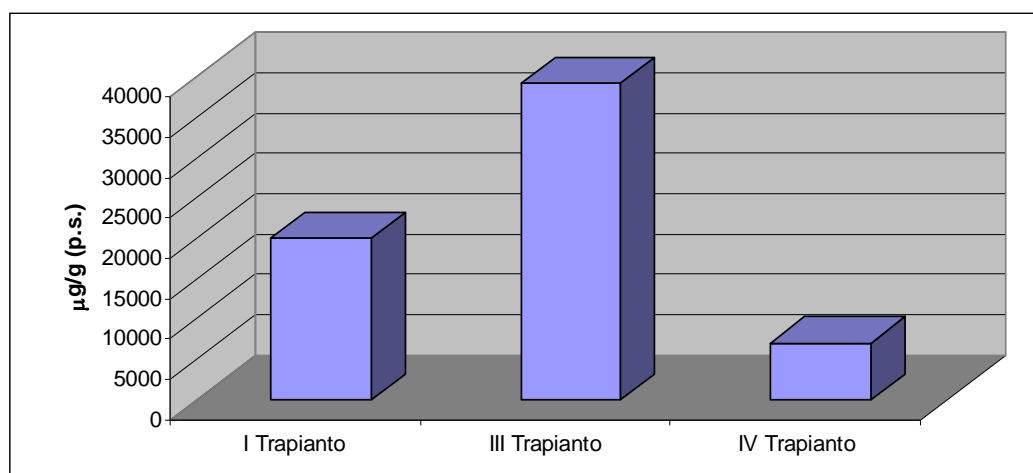


Figura 3.21 – Mediana della concentrazione del calcio all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

L'osservazione della figura 3.16 mette chiaramente in evidenza che solo nel caso del terzo trapianto si verifica un fenomeno di bioaccumulo "diffuso" nei talli collocati nell'area di monitoraggio. Nel primo e nel quarto trapianto solo cadmio e piombo, in un caso, sodio e selenio nell'altro, risultano incrementare la loro concentrazione rispetto a quella del bianco in un numero apprezzabile di stazioni. Al contrario, il fenomeno più diffuso risulta quello dell'invarianza di concentrazione rispetto ai talli dell'area sorgente (valore medio della % di stazioni per metallo: primo trapianto = 54,37%; terzo trapianto = 25,05%; quarto trapianto = 67,21%), seguito da quello di perdita (valore medio della % di stazioni per metallo: primo trapianto = 26,35%; terzo trapianto = 1,09%; quarto trapianto = 14,98%).

Nel caso del primo trapianto (maggio 2010 - luglio 2010) i licheni si trovano esposti a condizioni climatiche che, senza dubbio, differiscono sensibilmente da quelle della località La Fossata in Sila, ove sono stati raccolti, soprattutto in termini di scarto termico e di umidità.

Sebbene i dati di letteratura suggeriscano che le condizioni di secchezza possano promuovere l'accumulo del microparticolato recante gli elementi in traccia negli spazi intercellulari (Boonpragob & Nash, 1990), e che il concomitante aumento di temperatura ne stimola ulteriormente l'assunzione, risultando questa essere un processo che si verifica essenzialmente su base chimico - fisica (Nieboer *et al.*, 1976; Nieboer *et al.*, 1978), tuttavia recenti indicazioni (Vannini *et al.*, 2011) portano evidenze a favore del fatto che al di sopra dei 20°C cessa l'accumulo di metalli nel lichene

Pseudevernia furfuracea, un dato che potrebbe in parte supportare il risultato ottenuto nel presente lavoro.

D'altro canto va anche sottolineato che in tale trimestre è stata eseguita una valutazione ponderale della quantità di PM_{10} e $PM_{2,5}$ in una stazione sita a poca distanza dal cementificio (circa 900 metri) (Fig. 3.22).

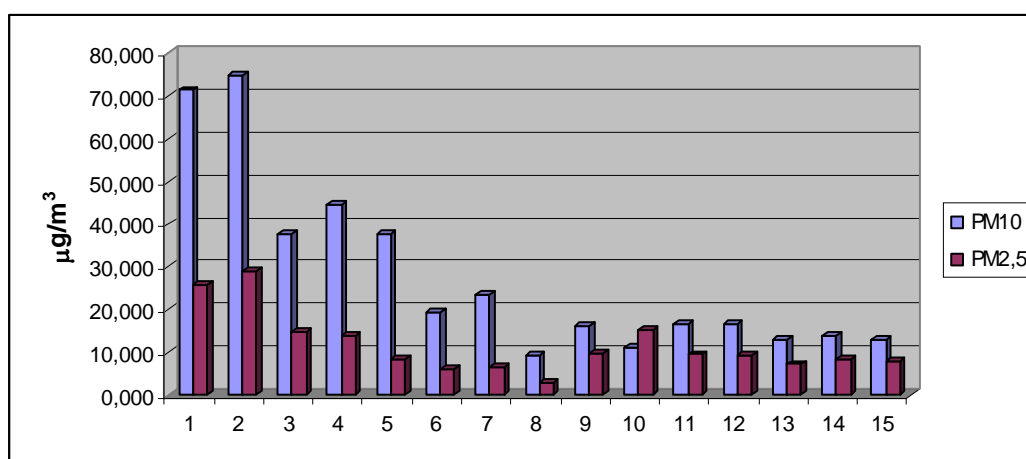


Figura 3.22 – Concentrazione del PM_{10} e del $PM_{2,5}$ determinata a circa 900 m ad est della Cementeria nel periodo 15 giugno 2010 - 29 giugno 2010.

Partendo dal presupposto che il Cementificio sia l'attività industriale più rilevante in zona è ragionevole ritenere che esso dia un contributo significativo alla concentrazione delle polveri sottili, per cui lo sviluppo di un marcato *trend* decrescente nella seconda metà del mese di giugno fa supporre che l'impianto potrebbe non avere lavorato con continuità, ipotesi in qualche modo supportata dalle informazioni raccolte dai residenti e dalla stampa locale, riferente di interruzioni dell'attività produttiva a seguito della messa in cassa integrazione di un certo numero di dipendenti.

Se ciò fosse vero si giustificerebbe ulteriormente lo scarso accumulo di metalli da parte dei trapianti di *Pseudevernia furfuracea*, già di per sé in una condizione di scarsa efficienza fisiologica per il summenzionato eccessivo scarto di temperatura ed umidità rispetto al proprio *optimum* ecologico.

Va infine ricordato che l'interruzione di attività inquinanti determina una riduzione relativamente rapida del contenuto in elementi in traccia nella biomassa lichenica (Walther *et al.*, 1990; Nieboer & Richardson, 1981) e che anche trapianti di durata abbastanza breve, quali quelli realizzati nel presente studio, possono produrre un

risultato di invarianza o perdita dell'ammontare di metalli rispetto ai livelli dell'area sorgente (Baptista *et al.*, 2008; Carreras *et al.*, 2005; Garty *et al.*, 1996).

Sostanzialmente si può affermare che, nel caso dei talli esposti da maggio 2010 a luglio 2010, non è possibile definire con certezza quale dei due fattori (condizioni climatiche avverse o marcata riduzione delle emissioni inquinanti) abbia contribuito al risultato ottenuto, o se si sia trattato di un concorso di entrambi.

I dati del terzo trapianto suggeriscono chiaramente lo sviluppo di un fenomeno di significativa e diffusa contaminazione atmosferica, soprattutto alla luce del fatto che il numero totale di casi che denotano rispettivamente accumulo ed elevato accumulo sono pari al 71,27% ed al 37,62% del totale, con lo zinco che risulta bioconcentrato nel numero più basso di stazioni (24/61) ed il vanadio nel numero più alto (61/61).

In tale periodo di esposizione le condizioni climatiche risultano decisamente più favorevoli alle richieste ecologiche di *Pseudevernia furfuracea*, particolarmente in termini di temperatura, risultando il suo massimo sviluppo soprattutto al di sopra dei 1000 m s.l.m., mentre l'incremento di umidità e di deposizioni umide, se da un lato tende a promuovere l'assorbimento dei metalli intrappolati negli spazi intercellulari (Nash & Gries, 1995), in quanto rende il lichene più attivo da un punto di vista fisiologico, dall'altro, per effetto del dilavamento delle piogge, incentiva la lisciviazione dei talli (Brown & Brown, 1991) riducendo il contenuto totale di metalli.

In tale periodo dell'anno, inoltre, i bassi valori di temperatura raggiunti nel corso della notte determinano lo sviluppo di inversioni termiche con il ristagno, nelle prime ore del mattino, delle masse d'aria a contatto con il suolo, con conseguente accumulo, all'interno di queste ultime, di eventuali inquinanti immessi in tale finestra temporale (Lazaridis, 2010), determinando un marcato aumento dell'esposizione dei talli ai flussi di contaminanti atmosferici.

L'analisi delle mediane delle concentrazioni (Figg. 3.17 - 3.21) e soprattutto dei valori per singola stazione di monitoraggio suggeriscono con evidenza che alcuni dei metalli raggiungono valori ampiamente paragonabili a quelli di talli presenti/esposti in aree ad elevata urbanizzazione/industrializzazione, supportando l'ipotesi che nel trimestre in oggetto, le attività produttive e di trasformazione presenti nell'area di studio abbiano determinato l'immissione di flussi di inquinanti in atmosfera.

Nella tabella 3.1 vengono riportate le concentrazioni dei metalli nei talli lichenici, gli intervalli di criticità rilevati (dalla soglia denotante associazione ad ambienti urbanizzati/industrializzati fino al valore più alto registrato), il numero di stazioni associate ed i relativi riferimenti bibliografici.

| Metalli | Intervalli critici di concentrazione rilevati ($\mu\text{g/g p.s.}$) | Numero di stazioni associate all'intervallo di criticità | Bibliografia |
|-----------|--|--|--|
| Sodio | 1010-2230 | 31 | Fletcher, 1976 |
| Magnesio | 1000-1800 | 50 | Fletcher, 1976; Garty <i>et al.</i> , 2003 |
| Alluminio | 1318-1926 | 21 | Lawrey & Rudolph, 1975; Williamson <i>et al.</i> , 2008; Bergamaschi <i>et al.</i> , 2007; Nimis & Bargagli, 1999 |
| Calcio | 4019-6819 | 29 | Fletcher, 1976; Freitas <i>et al.</i> , 2001; Godinho <i>et al.</i> , 2008 |
| Ferro | 1720-4033 | 55 | Nieboer <i>et al.</i> , 1977; Adamo <i>et al.</i> , 2003; Olowoyo <i>et al.</i> , 2011; Nimis & Bargagli, 1999 |
| Rame | 76-1376 | 6 | Carreras <i>et al.</i> , 2009; Williamson <i>et al.</i> , 2008; Adamo <i>et al.</i> , 2003; Nimis & Bargagli, 1999 |
| Vanadio | 5,11-8,28 | 25 | Garty <i>et al.</i> , 2001; Garty <i>et al.</i> , 2003; Adamo <i>et al.</i> , 2003; Nimis & Bargagli, 1999 |
| Manganese | 80-132 | 32 | Adamo <i>et al.</i> , 2003; Nimis & Bargagli, 1999 |

Tabella 3.1 – Metalli rinvenuti nei talli esposti nel trimestre novembre 2010 - gennaio 2011 le cui concentrazioni risultano presumibilmente associate a processi di contaminazione atmosferica.

Ciò che appare rilevante è che tra tali metalli vi sono il calcio ed il ferro che non solo sono componenti principali del cemento^[3] e soprattutto delle emissioni associate alla manifattura del cemento (Tab. 3.2), ma che spesso sono stati rilevati in quantità significative all'interno di talli lichenici o di altri organismi epifiti utilizzati per il monitoraggio dell'attività di cementifici (Branquinho *et al.*, 2008; Montero Alvarez *et al.*, 2006; Zambrano García *et al.*, 2009; Józwiak, 2009).

Ai fini di ottenere un'ulteriore indicazione sulla possibile implicazione delle emissioni derivanti dalla cementeria, quale fattore contribuente al bioaccumulo dei metalli misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti in tale trimestre, è stato calcolato il rapporto tra i metalli analizzati nei talli esposti nell'area di studio ed il ferro ed il calcio, in quanto questi ultimi ritenuti dei traccianti efficaci delle emissioni relative all'attività di manifattura del cemento.

Successivamente, dal momento che la cementeria di Castrovillari dichiara di utilizzare quale combustibile petcoke unitamente a RSU e detrito derivante da pneumatici dismessi, tale rapporto è stato calcolato tra gli stessi metalli ed il ferro ed il calcio, relativamente tanto ai fattori di emissione determinati dall'EPA (espressi in Kg/Mg) per impianti che utilizzano miscele di carbone - rifiuti quanto alle concentrazioni (esprese in $\mu\text{g}/\text{m}^3$) nelle emissioni di un impianto utilizzante solo petcoke e petcoke -

truciolato da pneumatici dismessi^[9] (Hall *et al.*, 1979; Fiscus *et al.*, 1977; Fiscus *et al.*, 1980; Mukherjee *et al.*, 2001). I risultati sono stati messi a confronto nella tabella 3.2.

Ovviamente quanto emerso da tale elaborazione va considerato con una certa cautela vista sia la natura eterogenea delle fonti sia il fatto che i rapporti relativi dei metalli nel particolato non necessariamente riflettono quelli nei talli, in quanto i metalli possono manifestare processi di competizione per i siti di captazione presenti sulla parete cellulare dei talli (Baptista *et al.*, 2008; Nieboer *et al.*, 1978).

Appare interessante evidenziare come i rapporti Fe/Ca e Ca/Fe appaiano abbastanza paragonabili, il che rappresenta una prima apprezzabile verifica sulla potenziale origine di tali elementi. Tra gli altri metalli rinvenuti nelle concentrazioni più elevate la migliore corrispondenza si ha nel caso del rame con il ferro, seguito dal magnesio con il calcio e dall'alluminio e dall'arsenico con il ferro.

Per quanto riguarda gli altri metalli alquanto buona appare la somiglianza dei rapporti tra berillio e zinco con il ferro e del potassio con il calcio.

Un altro riscontro sulla possibile derivazione dei metalli dalle emissioni atmosferiche del cementificio è stato ottenuto eseguendo un'analisi di correlazione tra la concentrazione dei metalli rinvenuta all'interno dei talli di *Pseudevernia furfuracea* in ciascun sito di monitoraggio e la distanza dalla centrale di questi ultimi. Solo quattro elementi hanno prodotto un coefficiente di correlazione statisticamente significativo e segnatamente, l'arsenico ($r = 0,368$, $p = 0,004$), il cadmio ($r = 0,280$, $p = 0,029$), l'antimonio ($r = 0,287$, $p = 0,025$) ed il molibdeno ($r = -0,502$, $p = 0,000$).

È significativo sottolineare che i primi tre, la cui concentrazione stazionaria sembra incrementare con l'aumento della distanza, risultano associati soprattutto alle frazioni particellari più piccole, derivanti dai processi di combustione e, come tali, sono massimamente volatilizzati^[9] (Fernandez *et al.*, 1992), risultando dunque trasportati a maggiore distanza dal vento, mentre il molibdeno, che invece mostra una variazione della concentrazione intratallica per sito di monitoraggio inversamente correlata con la distanza dalla cementeria, appare associato solo in minima parte con la frazione più volatile derivante dalla combustione di derivati fossili^[9]. Quindi il molibdeno ha una scarsa propensione ad essere trasportato ad elevate distanze dalle relative sorgenti atmosferiche.

Per quanto attiene al quarto trapianto i valori medi di temperatura ed umidità appaiono del tutto paragonabili a quelli del trimestre precedente, per cui si può ritenere che i talli esposti non debbano soffrire alcuno stress fisiologico derivante da un discostamento eccessivo dai relativi *optima* biologici e che la capacità di accumulare metalli sia primariamente dipendente dalla loro disponibilità in atmosfera.

CAPITOLO 3

| METALLI | RAPPORTO METALLI/Fe RELATIVO AI FATTORI DI EMISSIONE DA FORNI PER LA PRODUZIONE DEL CEMENTO PORTLAND USANDO QUALE COMBUSTILE UNA MISCELA CARBONE/COMBUSTIBILI DA RIFIUTO | RAPPORTO METALLI/Ca RELATIVO AI FATTORI DI EMISSIONE DA FORNI PER LA PRODUZIONE DEL CEMENTO PORTLAND USANDO QUALE COMBUSTILE UNA MISCELA CARBONE/COMBUSTIBILI DA RIFIUTO | RAPPORTO METALLI/Fe NEL PARTICOLATO DERIVANTE DALLA COMBUSTIONE DI CARBONE/PETCOKE | RAPPORTO METALLI/Fe NEL PARTICOLATO DERIVANTE DALLA COMBUSTIONE DI CARBONE/PETCOKE/TRUCIOLATO DA PNEUMATICI | RAPPORTO METALLI/Fe NEI TALLI LICHENICI DI <i>Pseudevernia furfuracea</i> | RAPPORTO METALLI/Ca NEI TALLI LICHENICI DI <i>Pseudevernia furfuracea</i> |
|----------------|---|---|---|--|--|--|
| Al | 0,764 | 0,0541666 | | | 0,54971 | 0,0294001 |
| As | 0,000764 | 0,000054166 | 0,007161 | 0,0101342 | 0,005284 | 0,0002715912 |
| Ba | 0,027 | 0,00191666 | | | 0,0071618 | 0,0003827 |
| Ca | 14,117 | | | | 19,03309 | |
| Cd | 0,00049 | 0,000035 | 0,000709677 | 0,002214765 | 0,000112869 | 0,000005982 |
| Cr | 0,000458 | 0,0000325 | 0,00716129 | 0,1416107 | 0,0014262 | 0,000076477 |
| Cu | 0,305 | 0,0216666 | 0,002387 | 0,02214765 | 0,02138137 | 0,00137681 |
| Pb | 0,0423 | 0,003 | 0,008365 | 0,048322 | 0,00231849 | 0,0001237504 |
| V | | | 0,01673118 | 0,06711409 | 0,0022389 | 0,0001204 |
| Fe | | 0,0708333 | | | | 0,0538945 |
| K | 1,0588 | 0,075 | | | 1,6054729 | 0,0854699 |
| Mn | 0,0505 | 0,0035833 | 0,011935 | 0,1939597 | 0,037409 | 0,001995677 |
| Mg | 0,318 | 0,0227 | | | 0,5387511 | 0,0286234 |
| Na | | | | | 0,45412 | 0,024273 |
| Se | 0,0117 | 0,00083333 | | | 0,000078459 | 0,00004224207 |
| Be | 0,0000388 | 0,00000275 | | | 0,000032064 | 0,00000167559 |
| Sb | | | | | 0,00013020 | 0,000006900072 |
| Mo | | | | | 0,0001709668 | 0,00000920557 |
| Zn | 0,0317 | 0,00225 | 0,0309677 | 0,3087919 | 0,025491 | 0,00137546138 |
| Ni | | | 0,004774 | 0,0295302 | 0,00082294 | 0,0000440212 |

Tabella 3.2 – Rapporto tra i metalli misurati nei talli esposti nell'area di studio e ferro e calcio. Tale rapporto è stato calcolato tra i fattori di emissione dei metalli espressi in Kg/Mg indicati dall'*Environmental Protection Agency* degli USA^[3], colonne 1 e 2; tra le concentrazioni dei metalli espresse in $\mu\text{g}/\text{m}^3$, colonne 3 e 4 (Hall *et al.*, 1979; Fiscus *et al.*, 1977; Fiscus *et al.*, 1980; Mukherjee *et al.*, 2001) e tra le concentrazioni dei metalli, espresse in $\mu\text{g}/\text{g}$ p.s., determinate nei talli lichenici nel trimestre novembre 2010 - gennaio 2011, colonne 5 e 6.

Ne deriva quindi che il risultato ottenuto, bioaccumulo, in media, in sole 5 stazioni su 61 per singolo metallo, con una marcata prevalenza della condizione di invarianza rispetto al controllo (67,21% dei casi), nel trimestre febbraio 2011 - aprile 2011, molto probabilmente dipende da una rilevante riduzione delle emissioni atmosferiche di microparticolato associato agli elementi presi in esame.

Ai fini di un'ulteriore riscontro sullo stato della qualità dell'aria in relazione ai livelli di contaminazione atmosferica da parte di metalli pesanti si è proceduto all'inquadramento delle singole stazioni, per ciascun trapianto, in livelli di naturalità/alterazione in base al sistema di classificazione proposto da Nimis & Bargagli (1999) (Tab. 3.3) ed in base ad un sistema di classificazione elaborato nel corso di svolgimento della presente tesi di dottorato (Tab. 3.4), utilizzando il maggior numero possibile di riferimenti bibliografici reperibili inerenti licheni foliosi/fruticosi utilizzati in trapianti per un periodo di esposizione massimo da 3 a 6 mesi (Adamo *et al.*, 2003; Ayrault *et al.*, 2007; Bačkor & Loppi, 2009; Baptista *et al.*, 2008; Bargagli, 1995; Bari *et al.*, 2001; Basile *et al.*, 2008; Bergamaschi *et al.*, 2007; Bialońska & Dayan, 2005; Campo *et al.*, 1996; Carreras & Pignata, 2002; Carreras *et al.*, 2005; Carreras *et al.*, 2009; Cercasov *et al.*, 2002; Conti & Cecchetti, 2001; Frati *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2001; Garty, 2001; Garty *et al.*, 2000; Garty *et al.*, 2001; Garty *et al.*, 2003; Godinho *et al.*, 2004; Godinho *et al.*, 2008; Godinho *et al.*, 2009; González & Pignata, 1997b; Guidotti *et al.*, 2009; Loppi, 2006; Loppi & Pirintos, 2003; Loppi *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2003; Nieboer *et al.*, 1978; Nimis & Bargagli, 1999; Olowoyo *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2008; Paoli *et al.*, 2010b; Reis *et al.*, 1999; Rusu *et al.*, 2006; Sanità Di Toppi *et al.*, 2008; Sloof, 1995; Sloof & Wolterbeek, 1992; Tyler, 1989; Walther *et al.*, 1990; Wappelhorst *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 2008; Wolterbeek, 2002).

Allo scopo di individuare le soglie per la definizione dei differenti livelli di naturalità/alterazione tutte le concentrazioni rinvenute in talli esposti in distretti territoriali caratterizzati da marcata antropizzazione (aree urbane, siti industriali, attività minerarie, arterie stradali ad intenso traffico *etc.*) e tutte le concentrazioni rinvenute in talli presenti in siti ad elevata naturalità sono state, per ciascun metallo, rankizzate, sottoposte ad analisi degli *outliers* che sono stati successivamente rimossi, messe a confronto per individuare il segmento di sovrapposizione e successivamente suddivise in quartili per la definizione dei livelli suddetti. Non è stato possibile eseguire una suddivisione in percentili minori vista la dimensione, relativamente limitata, del repertorio di dati di letteratura indagato. Ovviamente un obiettivo futuro è quello di implementare la ricerca delle fonti per aumentare il numero dei livelli ed individuare con maggiore accuratezza i valori delle soglie.

I risultati ottenuti sono mostrati nelle tabelle 3.5 - 3.7, di seguito presentate. In ciascuna colonna è riportato il numero di stazioni che, per singolo metallo, si posiziona nella corrispondente classe di qualità dell'aria. Le sigle alla testa di ciascuna colonna hanno il seguente significato: N. = naturalità; N.B. = bassa naturalità; A.M. = media alterazione; A. = alterazione; N.M.E. = naturalità molto elevata; N.E. = naturalità elevata; N.M. = media naturalità; B.N./A. = bassa naturalità/alterazione; A.M. = media alterazione; A.E. = alterazione elevata; A.M.E. = alterazione molto elevata.

| | Naturalità molto elevata | Naturalità elevata | Media naturalità | Bassa naturalità/alterazione | Media alterazione | Alterazione elevata | Alterazione molto elevata |
|----|--------------------------|--------------------|------------------|------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| Al | <350 | 600 | 1000 | 1600 | 2500 | 3200 | >3200 |
| As | <0,2 | 0,6 | 1,2 | 1,9 | 2,4 | 3 | >3 |
| Ba | <3,3 | 6 | 10 | 18 | 25 | 25 | >35 |
| Cd | <0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,4 | 2 | 2,6 | <2,6 |
| Cr | <1,2 | 2,2 | 4 | 6 | 9 | 16 | >16 |
| Cu | <7 | 10 | 15 | 25 | 34 | 53 | >53 |
| Fe | <290 | 500 | 800 | 1200 | 1500 | 1800 | >1800 |
| Mn | <20 | 25 | 35 | 60 | 90 | 140 | >140 |
| Ni | <1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 8 | >8 |
| Pb | <4 | 10 | 25 | 55 | 80 | 108 | >108 |
| V | <0,63 | 1,7 | 3,1 | 5,1 | 6,7 | 9,3 | >9,3 |
| Zn | <30 | 40 | 65 | 94 | 115 | 155 | >155 |
| Be | <0,04 | 0,08 | 0,12 | 0,60 | 0,70 | 1,15 | >1,15 |
| Se | <0,04 | 0,15 | 0,30 | 0,40 | 0,70 | 0,90 | >0,90 |

Tabella 3.3 – Scala di naturalità/alterazione di Nimis & Bargagli (1999) (concentrazioni dei metalli nei licheni espresse in µg/g p.s.).

| | Naturalità | Bassa naturalità | Moderata alterazione | Alterazione |
|----|------------|------------------|----------------------|-------------|
| Cd | <0,08 | 0,65 | 1,365 | >1,365 |
| Cr | <0,2 | 4,78 | 6,95 | >6,95 |
| Cu | <3,7 | 10,41 | 15,3 | >15,3 |
| Ni | <0,9 | 8,56 | 11,15 | >11,15 |
| Pb | <2,25 | 15 | 30 | >30 |
| Zn | <16,1 | 87 | 150 | >150 |
| Na | <60 | 350 | 707 | >707 |
| Ca | <2500 | 19190 | 22929 | >22929 |
| V | <1,49 | 4,90 | 6,40 | >6,40 |
| Fe | <176 | 1540 | 1685 | >1685 |
| Co | <0,12 | 0,77 | 1 | >1 |
| As | <0,32 | 0,79 | 0,91 | >0,91 |
| Sb | <0,11 | 0,38 | 0,56 | >0,56 |
| Ba | <7,6 | 20 | >20 | |
| Mg | <500 | 1000 | 1227,5 | >1227,5 |
| Mn | <18,2 | 128 | >128 | |
| Al | <12,8 | 1000 | 1999 | >1999 |

Tabella 3.4 – Scala di naturalità/alterazione calcolata secondo i riferimenti bibliografici (concentrazioni dei metalli nei licheni espresse in µg/g p.s.).

| PRIMO TRAPIANTO | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|------|------|----|--|------|------|---------|------|------|--------|---|
| ELEMENTI | SCALA RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | | | | SCALA DI NATURALITÀ/ALTERAZIONE NIMIS & BARGAGLI | | | | | | | |
| | N. | N.B. | A.M. | A. | N.M.E. | N.E. | N.M. | B.N./A. | A.M. | A.E. | A.M.E. | |
| Sodio | 0 | 15 | 28 | 0 | | | | | | | | |
| Magnesio | 2 | 21 | 15 | 5 | | | | | | | | |
| Alluminio | 0 | 8 | 34 | 1 | 0 | 2 | 6 | 21 | 14 | 0 | 0 | |
| Calcio | 0 | 17 | 12 | 14 | | | | | | | | |
| Vanadio | 31 | 11 | 0 | 1 | 2 | 33 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Cromo | 0 | 43 | 0 | 0 | 41 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Manganese | 1 | 42 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 28 | 11 | 1 | 1 | 0 |
| Ferro | 0 | 33 | 5 | 5 | 0 | 1 | 5 | 16 | 8 | 10 | 10 | 3 |
| Cobalto | 0 | 43 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Nichel | 2 | 40 | 0 | 1 | 2 | 11 | 24 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Rame | 40 | 3 | 0 | 0 | 41 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Zinco | 2 | 40 | 1 | 0 | 13 | 16 | 13 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Arsenico | 6 | 37 | 0 | 0 | 2 | 35 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cadmio | 1 | 42 | 0 | 0 | 22 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Antimonio | 4 | 37 | 1 | 1 | | | | | | | | |
| Bario | 3 | 36 | 4 | 0 | 0 | 2 | 5 | 28 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| Piombo | 4 | 39 | 0 | 0 | 25 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Selenio | | | | | 0 | 14 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Berillio | | | | | 3 | 37 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Tabella 3.5 – Ripartizione delle stazioni tra le varie classi di qualità ambientale relative alle due scale (N.B. e S.R.B.) adottate per la valutazione dello stato dell'atmosfera nell'area di studio nel primo trapianto.

| TERZO TRAPIANTO | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|------|------|----|--|------|------|---------|------|------|--------|----|
| ELEMENTI | SCALA RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | | | | SCALA DI NATURALITÀ/ALTERAZIONE NIMIS & BARGAGLI | | | | | | | |
| | N. | N.B. | A.M. | A. | N.M.E. | N.E. | N.M. | B.N./A. | A.M. | A.E. | A.M.E. | |
| Sodio | 0 | 1 | 11 | 49 | | | | | | | | |
| Magnesio | 1 | 11 | 29 | 20 | | | | | | | | |
| Alluminio | 0 | 16 | 45 | 0 | 0 | 2 | 14 | 39 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Calcio | 0 | 0 | 0 | 61 | | | | | | | | |
| Vanadio | 0 | 31 | 24 | 6 | 0 | 7 | 0 | 29 | 19 | 6 | 6 | 0 |
| Cromo | 0 | 59 | 0 | 2 | 4 | 15 | 39 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Manganese | 0 | 60 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | 37 | 15 | 15 | 0 |
| Ferro | 0 | 7 | 0 | 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 | 4 | 50 |
| Cobalto | 0 | 61 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Nichel | 0 | 61 | 0 | 0 | 4 | 44 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rame | 1 | 52 | 1 | 7 | 28 | 23 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| Zinco | 0 | 58 | 2 | 0 | 1 | 8 | 46 | 3 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| Arsenico | 10 | 43 | 3 | 5 | 2 | 48 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| Cadmio | 0 | 61 | 0 | 0 | 0 | 1 | 43 | 15 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| Antimonio | 0 | 58 | 0 | 3 | | | | | | | | |
| Bario | 0 | 55 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 47 | 8 | 4 | 4 | 0 |
| Piombo | 0 | 61 | 0 | 0 | 10 | 50 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabella 3.6 – Ripartizione delle stazioni tra le varie classi di qualità ambientale relative alle due scale (N.B. e S.R.B.) adottate per la valutazione dello stato dell'atmosfera nell'area di studio nel terzo trapianto.

| QUARTO TRAPIANTO | | | | | | | | | | | | |
|------------------|---------------------------------|------|------|----|--|------|------|---------|------|------|--------|--|
| ELEMENTI | SCALA RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | | | | SCALA DI NATURALITÀ/ALTERAZIONE NIMIS & BARGAGLI | | | | | | | |
| | N. | N.B. | A.M. | A. | N.M.E. | N.E. | N.M. | B.N./A. | A.M. | A.E. | A.M.E. | |
| Berillio | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 59 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Sodio | 0 | 39 | 18 | 4 | | | | | | | | |
| Magnesio | 0 | 22 | 29 | 10 | | | | | | | | |
| Alluminio | 0 | 6 | 55 | 0 | 0 | 0 | 6 | 47 | 8 | 0 | 0 | |
| Calcio | 0 | 61 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Vanadio | 56 | 5 | 0 | 0 | 1 | 58 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Cromo | 0 | 61 | 0 | 0 | 59 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Manganese | 0 | 61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 51 | 7 | 0 | 0 | |
| Ferro | 0 | 58 | 1 | 2 | 0 | 1 | 5 | 31 | 20 | 3 | 1 | |
| Cobalto | 61 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Nichel | 0 | 61 | 0 | 0 | 0 | 24 | 36 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| Rame | 56 | 4 | 0 | 1 | 0 | 28 | 28 | 0 | 4 | 0 | 1 | |
| Zinco | 0 | 59 | 1 | 1 | 5 | 19 | 34 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| Arsenico | 58 | 1 | 0 | 2 | 56 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| Cadmio | 0 | 61 | 0 | 0 | 44 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Selenio | | | | | 0 | 28 | 32 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| Antimonio | 4 | 54 | 3 | 0 | | | | | | | | |
| Bario | 0 | 61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 50 | 5 | 0 | 0 | |
| Piombo | 11 | 50 | 0 | 0 | 59 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Tabella 3.7 – Ripartizione delle stazioni tra le varie classi di qualità ambientale relative alle due scale (N.B. e S.R.B.) adottate per la valutazione dello stato dell'atmosfera nell'area di studio nel quarto trapianto.

La classificazione stazionale ovviamente conferma l'assenza di criticità ambientali in termini di contaminazione atmosferica da metalli pesanti nel caso del primo e del quarto trapianto mentre, per il terzo, suggerisce lo sviluppo di sensibili processi di inquinamento diffuso dovuti al sodio, magnesio, calcio, ferro, alluminio, manganese e vanadio (Tab. 3.6), mentre il rame si caratterizza per il raggiungimento di concentrazioni piuttosto critiche solo in un numero esiguo di stazioni.

Nelle figure 3.23 - 3.25 e nelle figure 3.26 - 3.28 sono illustrati rispettivamente i valori di tendenza centrale dei parametri ecofisiologici e del loro differenziale rispetto ai talli derivanti dall'area sorgente (Talli Esposti – Talli Non Esposti/Talli Non Esposti) per ciascuno dei trimestri di esposizione. Anche in tal caso è stata utilizzata la mediana ed i *boxplots* relativi (con indicazione degli *outliers*) sono presentati in Allegato I.

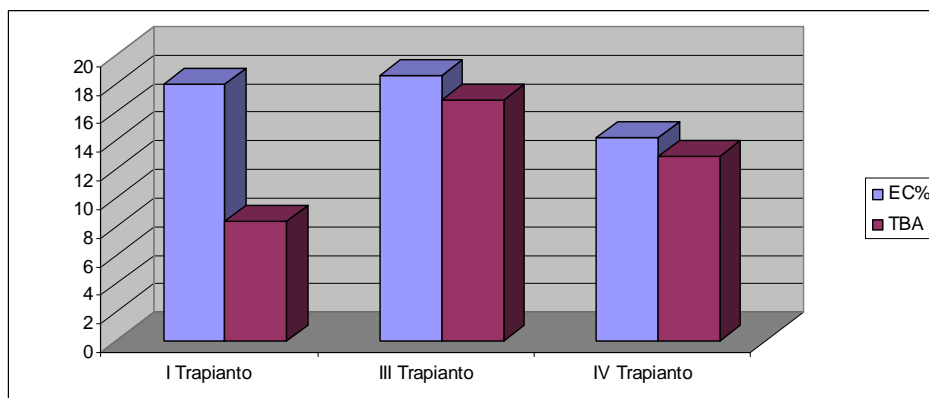


Figura 3.23 – Mediana dei valori della EC% e delle sostanze TBA reattive ($\mu\text{Moli/g p.s.}$) misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

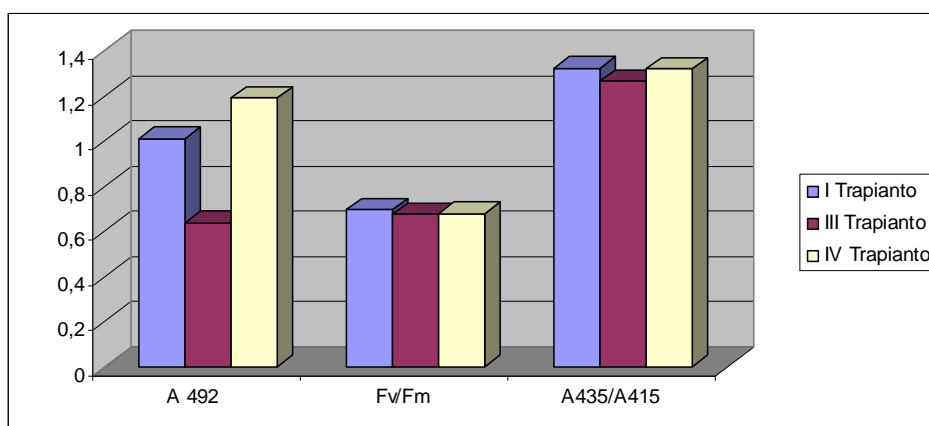


Figura 3.24 – Mediana dei valori della respirazione (A492), dell'efficienza fotosintetica (Fv/Fm) e del coefficiente di feofitinizzazione (A435/A415) misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

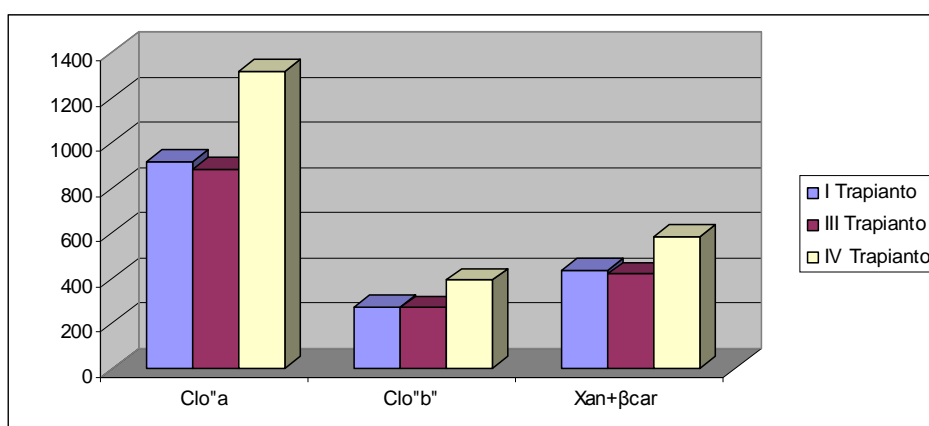


Figura 3.25 – Mediana dei valori della clorofilla "a", della clorofilla "b" e delle Xantofille + β carotene misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

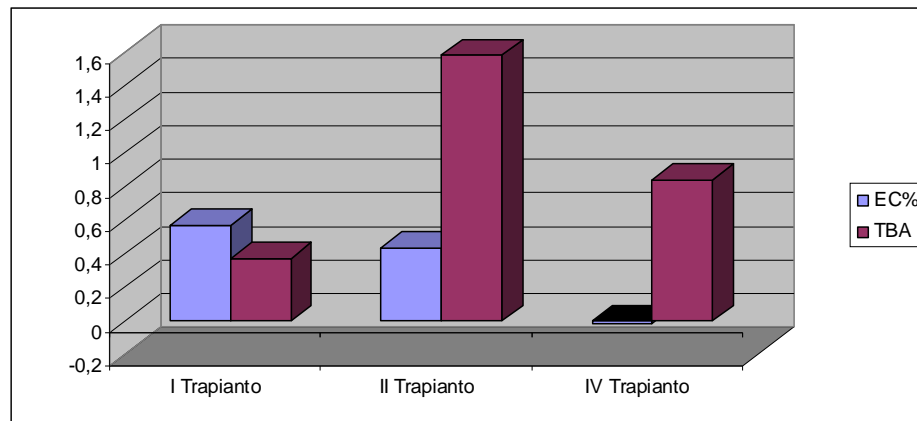


Figura 3.26 – Mediana dei valori del differenziale tra talli Esposti e talli Non Esposti della EC% e delle sostanze TBA reattive ($\mu\text{Moli/g p.s.}$) misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

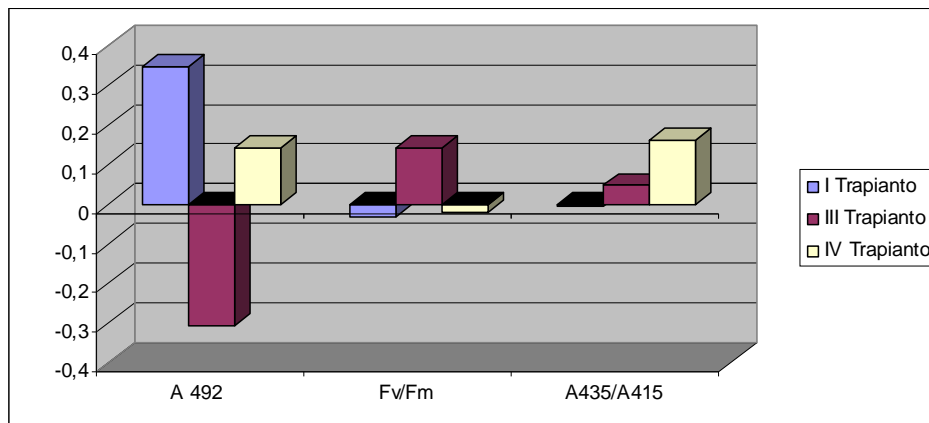


Figura 3.27 – Mediana dei valori del differenziale tra talli Esposti e talli Non Esposti della respirazione (A492), dell'efficienza fotosintetica (Fv/Fm) e del coefficiente di feofitizzazione (A435/A415) misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

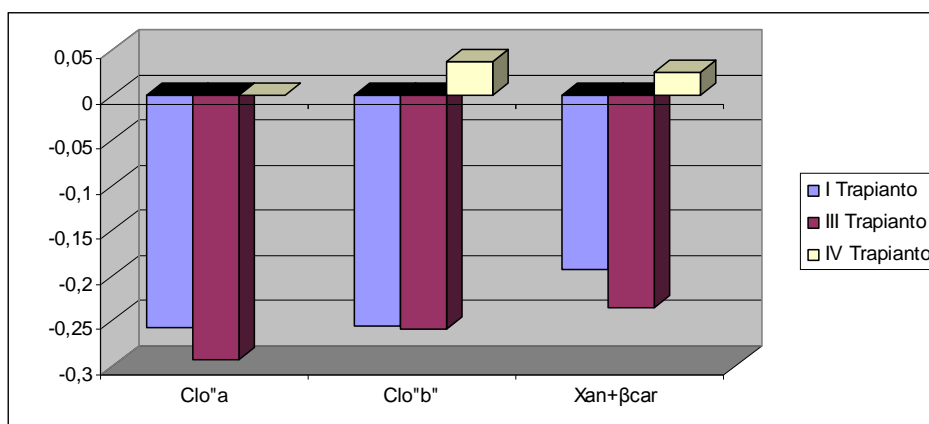


Figura 3.28 – Mediana dei valori del differenziale tra talli Esposti e talli Non Esposti della clorofilla "a", della clorofilla "b" e delle Xantofille + β carotene misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* esposti nell'area di studio.

La tabella 3.8 riporta i risultati dell'Anova non parametrica ad 1 via (*Kruskall – Wallis*) e quelli del *Nemeneyi test* per il confronto multiplo di mediane relativi ai valori dei parametri ecofisiologici misurati nei tre trapianti lichenici.

| Parametri ecofisiologici | H | p | C.S.S. (p < 0,05) |
|--------------------------|-------|-------|---|
| EC% | 17,49 | 0,000 | I Trap. e III Trap. > IV Trap. |
| TBA RS | 31,16 | 0,000 | III Trap. > I e IV Trap. IV Trap. > I Trap. |
| A492 | 40,02 | 0,000 | I e IV Trap. > III Trap. IV Trap. > I Trap. |
| Fv/Fm | 1,02 | 0,600 | ---- |
| Clo" a" | 64,7 | 0,000 | IV Trap. > I e III Trap. |
| Clo" b" | 67,6 | 0,000 | IV Trap. > I e III Trap. |
| Xan + β Car | 68,58 | 0,000 | IV Trap. > I e III Trap. |
| A435/A415 | 35,55 | 0,000 | I e IV Trap. > III Trap. |

Tabella 3.8 – Risultati dell'ANOVA parametrica ad 1 via e relativo *test post hoc* (*Nemeneyi test*) per la valutazione dei confronti tra mediane statisticamente significativi eseguita sulle mediane dei parametri ecofisiologici relativi ai tre trapianti lichenici realizzati nell'area di studio (C.S.S. = Confronti Statisticamente Significativi).

Infine nella tabella 3.9 sono mostrate le analisi di correlazione tra i parametri ecofisiologici utilizzando l'intera serie di osservazioni ottenuta in tutti e tre i trapianti.

Come detto in precedenza nel caso del primo trapianto le condizioni climatiche risultano avverse alle caratteristiche ecologiche di *Pseudevernia furfuracea* per cui è possibile che una certa quota di stress fisiologico rilevato in tale trimestre possa essere attribuibile a ciò.

Per quanto attiene alla conducibilità elettrica che rappresenta un efficace marcatore del danno di membrana (Bačkor & Loppi, 2009; Hart *et al.*, 1988; Belnap & Harper, 1990) ed i livelli di pigmenti fotosintetici, entrambi manifestano valori che si associano ad un sensibile scarto rispettivamente positivo e negativo rispetto al bianco (Figg. 3.26 e 3.28).

In tal senso è noto che l'aumento di temperatura si risolve, negli organismi vegetali, in un indebolimento dei legami all'interno del *bilayer* fosfolipidico (per l'incremento di energia cinetica) ed un'alterazione della struttura terziaria e quaternaria delle proteine transmembrana che regolano lo scambio ionico (Wahid *et al.*, 2007), con risultante aumento della permeabilità, come pure in una degradazione della clorofilla "a" e "b" (Karim *et al.*, 1999) associate alla elevata termolabilità delle membrane tilacoidali (McDonald & Paulsen, 1997) ed a meccanismi di stress ossidativo (Camejo *et al.*, 2006), i quali potrebbero a loro volta avere contribuito a determinare i livelli di sostanze TBA reattive misurati nei talli esposti.

| | EC% | | TBA RS | | A 492 | | Fv/Fm | | Clo"a" | | Clo"b" | | Xan + β car | | A435/A415 | |
|------------------------------------|-----|---|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------------------|-------|-----------|-------|
| | r | p | r | p | r | p | r | p | r | p | r | p | r | p | r | p |
| EC% | | | 0,170 | 0,029 | -0,087 | 0,266 | 0,045 | 0,566 | -0,259 | 0,001 | -0,237 | 0,002 | -0,253 | 0,001 | -0,121 | 0,121 |
| TBA RS | | | | | -0,226 | 0,004 | -0,112 | 0,152 | -0,225 | 0,004 | -0,133 | 0,090 | -0,203 | 0,009 | -0,290 | 0,000 |
| A 492 | | | | | | | -0,147 | 0,059 | 0,239 | 0,002 | 0,226 | 0,003 | 0,244 | 0,002 | 0,245 | 0,001 |
| Fv/Fm | | | | | | | | | 0,046 | 0,555 | -0,005 | 0,954 | 0,020 | 0,798 | 0,057 | 0,467 |
| Clo"a" | | | | | | | | | | | 0,960 | 0,000 | 0,990 | 0,000 | 0,599 | 0,000 |
| Clo"b" | | | | | | | | | | | | | 0,972 | 0,000 | 0,505 | 0,000 |
| Xan + βcar | | | | | | | | | | | | | | | 0,591 | 0,000 |
| A435/A415 | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabella 3.9 – Analisi di correlazione eseguita su tutte le osservazioni (n = 165) dei parametri ecofisiologici misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea*.

D'altro canto, vista l'attenzione dedicata dal presente studio solo ad una determinata, sia pure importante, tipologia di inquinanti, non è possibile escludere che allo sviluppo del danno rilevato possano avere concorso degli altri contaminanti, derivanti dal cementificio o da altre sorgenti locali di emissioni in atmosfera (area industriale di Castrovillari sita ad ovest della cementeria, sebbene di modeste dimensioni e, nominalmente, solo dedicata ad attività di servizi, depositi non autorizzati seminterrati di ingenti quantità di pneumatici soggetti, in passato, a combustione incontrollata; la presenza di cave che producono la materia prima per le attività di trasformazione dell'impianto - una principale sita a nord della cementeria ed una secondaria collocata nel versante occidentale; un'ampia fascia agricola sita a sud-est della cementeria e dei centri di Eianina e Frascineto; la bretella autostradale A3 che interseca, da nord-ovest a sud l'area di studio) o un effetto sinergistico di questi con le alte temperature (Wietschorke *et al.*, 1990).

La respirazione, al contrario dei summenzionati parametri, presenta una sensibile attivazione e tale risultato appare in linea sia, ancora una volta con i valori di temperatura registrati, in quanto questi comportano un aumento del tasso metabolico (Lambers, 1985) che può spesso risolversi nella sintesi di “*heat shock proteins*” (Nakamoto & Hiyama, 1999; Schöffl *et al.*, 1999) sia, possibilmente, con le concentrazioni di azoto ammoniacale (Figg. 3.7 e 3.8), che vista la natura acidofila di *Pseudevernia furfuracea*, potrebbero rappresentare livelli di apprezzabile eutrofizzazione, la quale è nota incrementare l'attività deidrogenasica lichenica (Cruz *et al.*, 2006).

Complessivamente si può presumere, sia pure con una certa cautela che, dal momento che la respirazione dei talli di solito tende ad essere depressa dalla presenza di contaminanti atmosferici (Lemaistre, 1985, Bačkor *et al.*, 2003, Nash III, 1975), mostrando al contrario tale parametro una notevole attivazione, i risultati ottenuti per la conducibilità elettrica ed i pigmenti fotosintetici sono da ascrivere, almeno a scala generale nell'ambito dell'area di studio, soprattutto ad un effetto del rialzo termico stagionale, anche se ciò non esclude affatto che a livello di zone più ristrette all'interno dell'area monitorata esista la possibilità che anche l'emissione di altri inquinanti possa avere concorso allo sviluppo del danno cellulare manifestato dal differenziale, rispetto al bianco, dei valori di conducibilità elettrica e dei pigmenti (Figg. 3.23, 3.25, 3.26, 3.28).

I valori di efficienza fotosintetica e di coefficiente di feofitinizzazione non mostrano mai tanto uno scarto apprezzabile nei confronti dei talli dell'area sorgente quanto una deviazione sensibile rispetto alle condizioni di assenza di stress indicate in letteratura (Bačkor & Loppi, 2009; Dzubai *et al.*, 2008).

Se si esamina il *trend* dei parametri passando dal primo al terzo trapianto si nota che, a fronte di una apparente relativa invarianza dei valori di conducibilità elettrica e di pigmenti fotosintetici, i livelli di sostanze TBA reattive rilevano un marcato incremento contemporaneamente ad una forte depressione dell'attività respiratoria.

Dal momento che le condizioni climatiche sono ora favorevoli alla fisiologia di *Pseudevernia furfuracea*, possiamo escludere un loro contributo alla manifestazione di una compromissione dei parametri ecofisiologici.

D'altro canto, come già detto in precedenza, il monitoraggio degli inquinanti si è focalizzato sulla determinazione delle concentrazioni nei talli di elementi in tracce, i quali effettivamente in tale trimestre mostrano un marcato fenomeno di bioaccumulo, con il raggiungimento, per diversi metalli, di livelli alquanto critici, laddove è ipotizzabile (vista la numerosità delle potenziali sorgenti di inquinanti nell'area di studio), che anche altri contaminanti (di natura non accertata) siano presenti concorrendo allo sviluppo del danno misurato.

Ciò potrebbe essere d'aiuto all'interpretazione dei risultati ottenuti, ovvero: se nel primo trapianto i livelli di danno sono stati interpretati come conseguenza dello stress termico unitamente alla verosimile presenza di altri inquinanti non monitorati, nel caso del terzo trapianto, a fronte della scomparsa di sfavorevoli valori di temperatura, ad essi si sostituirebbe lo stress da metalli pesanti agente, ancora una volta, con effetto additivo o sinergistico, con altri eventuali inquinanti presenti.

Resterebbe da spiegare perché ciò risulti in effetti distinto sui differenti gruppi di parametri.

Se si prende in esame l'analisi di correlazione eseguita sull'intero set di dati ($n = 165$) tra metalli e parametri ecofisiologici (Tab. 3.10), il primo dato che emerge con forza è che la maggior parte dei valori dei coefficienti di correlazione statisticamente significativi sono modesti o al più moderati, sottolineando il fatto che la variazione dei metalli pesanti all'interno dei talli si associa solo parzialmente alla variazione dei parametri ecofisiologici e ciò è un ulteriore indizio a favore del fatto che debbano esistere altri fattori (inquinanti) che probabilmente concorrono a determinare i livelli di *performance* fisiologica dei licheni trapiantati nell'area da monitorare.

In secondo luogo appare evidente che la conducibilità elettrica ed i pigmenti tendono a mostrare i rispettivi valori di "r" più elevati con quasi gli stessi metalli ovvero, primariamente calcio, seguito, in ordine diverso di priorità tra i suddetti parametri, da vanadio, piombo ed arsenico (sebbene la conducibilità si correli efficacemente anche con il molibdeno).

| <i>Metalli</i> | <i>EC%</i> | | <i>TBA RS</i> | | <i>A492</i> | | <i>Fv/Fm</i> | | <i>Clo "a"</i> | | <i>Clo "b"</i> | | <i>Xan + βCar</i> | | <i>A435/A415</i> | |
|----------------|------------|----------|---------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|-------------------|----------|------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> | <i>r</i> | <i>p</i> |
| Be | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Na | 0,194 | 0,013 | 0,267 | 0,001 | -0,374 | 0 | | | -0,352 | 0 | -0,33 | 0 | -0,363 | 0 | -0,324 | 0 |
| Mg | | | 0,215 | 0,006 | -0,2 | 0,01 | | | | | | | | | -0,16 | 0,041 |
| Al | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K | | | 0,208 | 0,008 | -0,352 | 0 | | | | | | | | | -0,204 | 0,009 |
| Ca | 0,292 | 0 | 0,212 | 0,006 | -0,458 | 0 | | | -0,503 | 0 | -0,496 | 0 | -0,522 | 0 | -0,353 | 0 |
| V | 0,229 | 0,003 | 0,316 | 0 | -0,404 | 0 | | | -0,431 | 0 | -0,398 | 0 | -0,439 | 0 | -0,371 | 0 |
| Cr | 0,173 | 0,027 | 0,344 | 0 | -0,37 | 0 | | | -0,361 | 0 | -0,324 | 0 | -0,37 | 0 | -0,348 | 0 |
| Mn | | | 0,344 | 0 | -0,448 | 0 | | | -0,4 | 0 | -0,376 | 0 | -0,41 | 0 | -0,363 | 0 |
| Fe | 0,167 | 0,033 | 0,318 | 0 | -0,391 | 0 | | | -0,325 | 0 | -0,288 | 0 | -0,331 | 0 | -0,322 | 0 |
| Co | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ni | | | | | 0,194 | 0,013 | | | | | | | | | | |
| Cu | | | 0,337 | 0 | -0,304 | 0 | | | -0,378 | 0 | -0,352 | 0 | -0,388 | 0 | -0,358 | 0 |
| Zn | | | 0,269 | 0,001 | -0,183 | 0,019 | | | | | | | | | -0,208 | 0,008 |
| As | 0,219 | 0,005 | | | -0,259 | 0,001 | | | -0,486 | 0 | -0,486 | 0 | -0,5 | 0 | -0,18 | 0,021 |
| Se | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mo | 0,269 | 0 | 0,253 | 0,001 | -0,165 | 0,035 | | | -0,179 | 0,022 | | | -0,189 | 0,019 | -0,173 | 0,027 |
| Cd | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sb | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ba | | | 0,168 | 0,031 | -0,174 | 0,026 | | | | | | | | | | |
| Pb | 0,246 | 0,001 | 0,18 | 0,021 | -0,386 | 0 | | | -0,43 | 0 | -0,411 | 0 | -0,443 | 0 | -0,282 | 0 |

Tabella 3.10 – Analisi di correlazione tra le concentrazioni dei metalli ed i valori dei parametri ecofisiologici misurati nei talli lichenici esposti relativamente all'intero periodo di studio (tre trapianti pari a 165 coppie di osservazioni).

La letteratura presenta un'ampia gamma di riferimenti relativi agli effetti nocivi delle deposizioni delle polveri alcaline derivanti da varie tipologie di attività umane, delle quali il calcio è presumibilmente un tracciante primario, sui licheni e particolarmente su quelli epifiti acidofili quali *Pseudevernia furfuracea* (Wittman & Turk, 1988; Loppi & Pirintos, 2000; Adamson & Seppelt, 1990; Gilbert 1976; Fletcher, 1973), sebbene i processi alla base della tossicità possano essere molto vari, quali il cambiamento di pH della corteccia (Pihlstrom, 1982, 1987), un effetto di ombreggiamento dovuto al ricoprimento da parte delle polveri od un'alterazione dei siti di scambio della parete cellulare, compromettendo l'assorbimento dei nutrienti vitali alla crescita (Farmer, 1993).

Studi eseguiti sul muschio epigeo *Mnium punctatum* (Czaja, 1966) hanno evidenziato che le polveri alcaline derivanti dalla manifattura del cemento inducono fenomeni di plasmolisi. Kortesharju *et al.* (1990) hanno dimostrato che, eseguendo un transetto a partire da un cementificio nella Finlandia del nord, era possibile rilevare una relazione inversa tra livelli di calcio e livelli di potassio nei tessuti del muschio terricolo *Pleurozium schreberi*, risultando rispettivamente i primi massimi vicino al cementificio ed i secondi minimi allontanandosi dalla centrale.

Anche Bates & Farmer (1990) hanno evidenziato, in un loro studio, che l'applicazione sperimentale di calcio a *Pleurozium schreberi*, determinava una deplezione dei livelli di potassio e magnesio intracellulari. Anche in questi casi è stato ipotizzato che il calcio abbia saturato la maggior parte dei siti di scambio prevenendo l'assunzione di nutrienti essenziali.

Alla luce dei risultati da noi ottenuti si potrebbe ipotizzare che una massiva deposizione alcalina abbia determinato un forte ombreggiamento della superficie dei talli di *Pseudevernia furfuracea* ed una riduzione dell'assorbimento dei nutrienti essenziali per la saturazione dei siti, contribuendo alla flessione dei livelli di pigmenti fotosintetici registrata, mentre l'accumulo di ioni alcalini negli spazi intercellulari potrebbe aver generato uno squilibrio osmotico innescando fenomeni di plasmolisi, perdita di ioni intracellulari ed alterazione irreversibile delle membrane (Adamec, 1984), tanto del micobionte quanto del fotobionte.

Diversi studi hanno evidenziato un possibile ruolo tossico di vanadio, piombo ed arsenico a carico della fotosintesi, della concentrazione di clorofilla e della permeabilità di membrana nei licheni (Punz, 1979; Richardson *et al.*, 1979; Garty *et al.*, 1997; LeSueur & Puckett 1980; Pisani *et al.*, 2010).

In tal senso va sottolineato che se da un lato tali metalli possono svolgere un ruolo tossico mediante la formazione di specie radicaliche (Rucińska & Gwózdź, 2005; Flora *et al.*, 2006; Goc, 2006), dall'altro vi sono indicazioni sperimentali che la loro

azione possa avvenire attraverso meccanismi differenti da quelli dello stress ossidativo.

Nel caso del piombo, vista la sua elevata affinità per i siti di scambio extracellulari (Nieboer & Richardson, 1980; Carreras & Pignata, 2002), ciò può verificarsi a seguito della sua capacità di spiazzare cationi essenziali quali il magnesio coinvolti nella sintesi della clorofilla, determinandone una diminuzione dell'assunzione (in analogia alla tossicità indotta dal calcio associata alle polveri alcaline) ed inducendo una riduzione dei livelli di pigmenti (Braquinho *et al.*, 1997; Carreras & Pignata, 2007) o di legarsi alla K-ATPasi ed ai gruppi -SH delle proteine di membrana causando un'alterazione di quest'ultima con perdita di potassio intracellulare (Sharma & Dubey, 2005).

Nel caso di vanadio ed arsenico (soprattutto) la loro tossicità si associa alle relative forme chimiche in cui questi metalli sono presenti e studi in vitro suggeriscono che essi possono legarsi ai gruppi sulfidrilici delle proteine di membrana, alterarne l'assemblaggio, ridurre la fluidità delle membrane e determinare citolisi (Zhang *et al.*, 2000).

I livelli di sostanze TBA reattive si associano primariamente a rame, cromo e ferro che sono tipiche specie redox - attive il cui danno si esercita principalmente a seguito dello sviluppo di reazioni Fenton che promuovono la formazione di forme radicaliche dell'ossigeno (Valko *et al.*, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007) e solo più debolmente a calcio, vanadio e piombo.

La respirazione si associa soprattutto al calcio e, secondariamente, a manganese seguito, rispettivamente, da vanadio, ferro, piombo, sodio e cromo, mentre più debole risulta l'associazione con l'arsenico.

Essa, quindi, sembra collocarsi in una posizione intermedia rispetto alla conducibilità elettrica ed ai livelli di sostanze TBA reattive, in termini di correlazione (inversa) con i metalli ed in via ipotetica ciò può essere ascritto al fatto che, essendo essa dipendente dall'attività degli enzimi deidrogenasici siti nelle membrane mitocondriali (Koolman & Roehm, 2005), una depressione dei suoi livelli può associarsi sia ad un danno di membrana rilevante quale quello derivante da un fenomeno di osmolisi sia ad un danno "relativamente" meno intenso che coinvolge essenzialmente le proteine di membrana per alterazione della struttura lipidica (gruppi perossile polari che distorcono l'allineamento delle catene alifatiche degli acidi grassi) o per *cross-linking* tra gruppi proteici generati dalla formazione di specie radicaliche (Fagian *et al.*, 1990).

Va sottolineato che osservando le correlazioni tra parametri ecofisiologici mostrate in tabella 3.9, la variazione della respirazione si correla in maniera

statisticamente significativa con quella dei livelli di sostanze TBA reattive, ma altrettanto non si verifica nel caso della conducibilità elettrica.

Il coefficiente di correzione tra conducibilità elettrica e sostanze TBA reattive risulta essere il più basso tra tutti quelli calcolati e la conducibilità elettrica si correla in maniera statisticamente significativa con la clorofilla "a" e "b" e la sommatoria di Xantofille e Carotenoidi, mentre le sostanze TBA reattive non si correlano con la clorofilla "b" e lo fanno in maniera leggermente più debole con gli altri pigmenti.

Complessivamente si può ipotizzare, quindi, che il contributo degli elementi accumulati nel terzo trapianto alla variazione dei parametri ecofisiologici si risolva tanto in una parziale comunanza di meccanismi di induzione del danno (essenzialmente su base ossidativa), quanto in una diversificazione degli stessi laddove si tenga presente che alcuni dei metalli possono generare un danno alle membrane cellulari anche attraverso un'alterazione degli equilibri osmotici generante plasmolisi e perdita dei soluti intracellulari.

L'osservazione dei valori assunti dai parametri ecofisiologici nel quarto trapianto e del differenziale relativo rispetto al bianco evidenziano una condizione di sensibile alleviamento dello stress ambientale, come indicato chiaramente dalla marcata riduzione della conducibilità elettrica e dall'aumento della respirazione e dei livelli dei pigmenti (clorofilla "a", "b" e xantofille + β carotene) (Figg. 3.23 - 3.28).

D'altro canto le sostanze TBA reattive, pur mostrando anch'esse una riduzione rispetto al terzo trapianto, presentano, tuttavia, una variazione meno significativa rispetto a quella degli altri indicatori di status fisiologico, come dimostra il fatto che le concentrazioni rilevate differiscono in maniera statisticamente significativa non solo dal trapianto precedente, ma anche dal primo trapianto, suggerendo il persistere di un certo livello di compromissione ambientale.

Dal momento che la contaminazione da metalli appare sostanzialmente risolta, come risulta dai dati di bioaccumulo (Fig. 3.16), anche tale risultato va nella direzione di confermare la presenza nell'area di studio di altri contaminanti che, mediante differenti meccanismi di azione, possono contribuire allo sviluppo di un danno cellulare.

Vale la pena sottolineare che il miglioramento dei livelli di respirazione cellulare e forse anche quello della clorofilla "a" e "b" potrebbe essere stato promosso dalle più favorevoli condizioni climatiche e dalla riduzione degli inquinanti.

Per quanto attiene il ruolo svolto dai livelli di azoto ammoniacale misurati (sebbene relativi ad un'area più limitata di quella complessivamente monitorata con i trapianti), tale dato (valore medio sul trimestre di $7,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) risulta non coerente con l'incremento del valore di tendenza centrale di questi parametri visto che le evidenze sperimentali più recenti suggeriscono che livelli di ammonio tra 1 e $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ potrebbero

già promuovere effetti ecologici significativi a carico della flora lichenica (Cape *et al.*, 2009) e, tutto sommato, neanche con le indicazioni della normativa europea (G.U.U.E., 2008) che fissa a $8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ la soglia di criticità per i licheni epifiti.

D'altro canto non esiste modo di dimostrare che l'incremento sarebbe stato maggiore in presenza di concentrazioni più basse di ammonio, per cui non è possibile avanzare ipotesi certe sul ruolo avuto dai valori di ammonio da noi registrati in tale periodo di esposizione sui talli di *Pseudevernia furfuracea*.

Inoltre le considerazioni fatte per i rapporti Fv/Fm ed A435/A415 nel caso del primo trapianto valgono anche per il terzo ed il quarto trapianto, raramente mostrando questi un scostamento apprezzabile dai valori tipici di licheni collocati in siti ad elevata naturalità.

Per quanto attiene al potenziale contributo della bretella autostradale A3 alla contaminazione atmosferica da metalli pesanti, sono stati presi in esame i valori di concentrazione e di bioaccumulo relativi a tutte le stazioni collocate in adiacenza del tratto di autostrada che interessava l'area monitorata.

In tabella 3.11 sono riportate, per ciascun metallo, le mediane dei valori di bioaccumulo, il *range* di concentrazioni, inteso come intervallo di valori tra il minimo ed il massimo registrati, ed il numero di stazioni.

Nel caso del primo trapianto si può evidenziare che, a fronte di un numero complessivo di 158 casi di bioaccumulo (numero massimo totale = 903, 43 stazioni x 21 metalli), 45 fanno riferimento alle stazioni adiacenti all'autostrada (il 28,48%).

D'altro canto il numero di stazioni che bioaccumulano, per singolo metallo, rispetto al totale, che interessano l'autostrada, è in media alquanto basso se si eccettuano il sodio ed il cadmio.

Partendo dal presupposto che i talli siano stati collocati ad una distanza idonea ad intercettare le emissioni associate al traffico autoveicolare (Campo *et al.*, 1996), risultando il trimestre in questione associato al picco di NO_x di luglio 2010, che dipende dagli intensi flussi turistici stagionali, ovvero che vi sia stata una significativa produzione di metalli derivanti dal transito autoveicolare, il fatto che i talli mostrino un'attività di bioaccumulo sostanzialmente bassa è un'indicazione a favore del fatto che le sfavorevoli condizioni climatiche abbiano inciso negativamente sulla capacità di assumere metalli.

| | PRIMO TRAPIANTO | | | TERZO TRAPIANTO | | | QUARTO TRAPIANTO | | |
|----|--------------------|--|---------------------------------|--------------------|--|---------------------------------|--------------------|--|---------------------------------|
| | <i>Mediana E/C</i> | <i>Numero di stazioni con talli che bioaccumulano rispetto al totale (15) che interessano l'autostrada</i> | <i>Min - Max concentrazioni</i> | <i>Mediana E/C</i> | <i>Numero di stazioni con talli che bioaccumulano rispetto al totale (15) che interessano l'autostrada</i> | <i>Min - Max concentrazioni</i> | <i>Mediana E/C</i> | <i>Numero di stazioni con talli che bioaccumulano rispetto al totale (15) che interessano l'autostrada</i> | <i>Min - Max concentrazioni</i> |
| Be | | | | 1,5 | 6 | 0,05-0,64 | | | |
| Na | 1,45145 | 10 | 173,3-635,4 | 3,08824 | 12 | 440-1480 | | | |
| Mg | | | | 1,45122 | 11 | 9,60-1810 | | | |
| Al | | | | 1,38362 | 7 | 1256,3-1781,2 | | | |
| K | | | | 1,38007 | 8 | 3310-4560 | | | |
| Ca | | | | 1,66242 | 9 | 2,10-7,8 | | | |
| V | 1,52432 | 3 | 1,31-1,98 | 3,0755 | 13 | 1,32-3,98 | | | |
| Cr | 1,26055 | 1 | 0,79 | 2,85086 | 12 | 1,32-3,98 | | | |
| Mn | | | | 1,32228 | 5 | 60,1-99,47 | 1,382256 | 1 | 40,7 |
| Fe | | | | 1,62633 | 11 | 1844-4033,2 | | | |
| Co | | | | 1,48276 | 11 | 0,36-0,64 | | | |
| Ni | 22,1913 | 1 | 2,63 | 2,29268 | 11 | 1,03-2,75 | | | |
| Cu | 1,69622 | 4 | 1,29-3,76 | 2,70482 | 13 | 3,54-159,8 | | | |
| Zn | 2,22249 | 1 | 49,7 | 1,30032 | 8 | 42,4-77,9 | | | |
| As | | | | 2,70588 | 11 | 0,36-0,72 | | | |
| Se | | | | 1,45455 | 10 | 0,13-0,18 | 1,60531 | 5 | 0,12-0,20 |
| Mo | 1,61033 | 5 | 0,14-0,45 | 1,36364 | 5 | 0,22-0,69 | | | |
| Cd | 1,67299 | 9 | 0,15-0,25 | | | 0,15-0,21 | | | |
| Sb | 1,65455 | 2 | 0,11-0,24 | 1,33333 | 5 | 0,17-0,65 | 1,733748 | 1 | 0,19-0,21 |
| Ba | 1,45581 | 3 | 14,8-20,9 | 2,31059 | 11 | 13,04-31,49 | | | |
| Pb | 1,46616 | 6 | 2,82-6,62 | 2,05252 | 13 | 3,05-7,91 | | | |

Tabella 3.11 – Per ciascun metallo analizzato sono mostrati la mediana dei valori del rapporto E/C relativi alle sole stazioni che mostrano un valore > 1,25, l'intervallo di concentrazioni (min - max) relativo allo stesso gruppo di stazioni ed il numero di stazioni.

Osservando il *range* di concentrazioni relative a tale trimestre si può notare che se da un lato i metalli che risultano essere bioaccumulati sono dei tipici traccianti delle emissioni autoveicolari (Garty, 2001; Gietl *et al.*, 2010; Di Lella, 2010), i valori registrati denoterebbero condizioni di debole contaminazione, probabilmente alla luce della scarsa efficienza con cui i licheni hanno assunto tali sostanze dall'atmosfera.

Tale risultato viene confermato anche dall'assenza completa di correlazione tra la variazione dei parametri ecofisiologici e le concentrazioni dei metalli verificata per il gruppo di stazioni associato alla sede autostradale.

Lo scenario si modifica drasticamente nel caso del terzo trapianto, con lo sviluppo di un sistematico bioaccumulo di metalli che, per le tipologie già individuate in precedenza (Tab. 3.11), mostrano il raggiungimento di picchi di concentrazione alquanto significativi.

Dal momento che in tale trimestre le densità autoveicolari sono decisamente inferiori al periodo estivo, come indicato anche dal picco assai modesto di NO_x rilevabile a dicembre 2010, si può ritenere che tale risultato sia ascrivibile ad altre sorgenti ambientali, presumibilmente le stesse che hanno determinato un processo diffuso e sistematico di contaminazione da metalli in tutta l'area di studio (a partire dalla cementeria).

Un ulteriore sostegno a tale interpretazione viene dall'osservazione dei dati inerenti al trimestre febbraio 2011 – aprile 2011, ove si può notare che, a fronte di favorevoli condizioni climatiche alla fisiologia di *Pseudevernia furfuracea* (come nel trimestre precedente) e di bassi valori di NO_x, quasi nessun metallo risulta essere bioaccumulato e, laddove ciò si verifica, esso raggiunge concentrazioni alquanto basse.

3.6 Valutazione del trend spaziale dell'accumulo di metalli pesanti e dei parametri ecofisiologici nel lichene *Pseudevernia furfuracea* durante il periodo di monitoraggio (maggio 2010 - aprile 2011)

3.6.1 Primo trapianto lichenico (maggio 2010 - luglio 2010)

Come visto in precedenza nel corso del primo trapianto la contaminazione da metalli pesanti appare un fenomeno di entità estremamente ridotta, al più limitata in qualche misura ad un paio di metalli (cadmio e piombo), per cui non è stato ritenuto necessario esplorare la variazione spaziale dei livelli di metalli indagati ai fini di una valutazione dell'entità della loro diffusione ambientale nell'area di studio e del rilevamento di picchi di criticità in termini di concentrazioni.

Viceversa, vista l'eterogeneità delle potenziali sorgenti di contaminanti atmosferici, ritenendo alquanto verosimile che potessero essere presenti altri tipi di inquinanti generanti una diversificazione spaziale dei parametri ecofisiologici indagati (anche in interazione tra loro e/o con le condizioni climatiche poco favorevoli alle richieste ecologiche di *Pseudevernia furfuracea*), il *dataset* di questi ultimi è stato sia utilizzato per la produzione di carte di isoconcentrazione a scala 1:25.000, realizzate mediante il pacchetto di programmi SURFER della Golden Software Inc. (Colorado, USA), uno dei più utilizzati nel campo del biomonitoraggio, per ottenere un'efficace rappresentazione della distribuzione territoriale dei valori assunti da tali parametri, sia sottoposto ad una duplice verifica mediante tecniche di analisi multivariata ed univariata, così da poter procedere all'individuazione di possibili *trend* differenti su scala locale attraverso un'adeguata validazione statistica che interpretasse in termini di significatività eventuali differenze rilevate.

L'osservazione delle carte di isoconcentrazione (Allegato III) ha messo in evidenza i seguenti aspetti.

Premesso che la maggior parte dei valori risultano inferiori al bianco e, quindi, si è in presenza di una condizione generalizzata di stress, la disamina dei singoli parametri rileva che tutti i pigmenti si caratterizzano per una elevata densità di valori critici (sensibilmente più bassi del bianco), soprattutto nel versante occidentale rispetto alla cementeria, un andamento solo parzialmente sovrapponibile a quello delle sostanze TBA reattive, che mostrano una zona di criticità anche a cavallo della cementeria e nel versante di sud-est, dove risultano presenti attività agricole alquanto intense. La conducibilità elettrica, al pari dei livelli di perossidazione, sviluppa i valori più elevati in corrispondenza dell'impianto dell'ITALCEMENTI e nel versante sud-occidentale.

Infine la respirazione presenta una condizione generalizzata di elevati valori con delle zone di criticità alquanto marginali site nei versanti di sud-ovest e sud-est ed in quello di nord-ovest.

Sebbene anche il coefficiente di feofitizzazione e l'efficienza fotosintetica mostrino una certa diversificazione dei rispettivi valori, tuttavia il loro *range* di oscillazione non appare mai discostarsi in maniera apprezzabile da quelli che sono ritenuti valori tipici di talli in condizioni di elevata naturalità e quindi la discussione dei loro andamenti appare di significato relativo.

Le tecniche di analisi multivariata utilizzate sono state una di ordinazione, la *Detrended Correspondence Analysis* (DCA) ed una di classificazione (*Cluster Analysis*), al fine di incrociarne i relativi risultati ed ottenere una conclusione più robusta.

Poiché tali tecniche non prevedono un test di significatività, successivamente è stata eseguita una MRPP (*Multi Response Permutation Procedure*) utilizzando come criterio di fattorializzazione quello dei “Gruppi” ottenuti dall’incrocio dei risultati delle due tecniche summenzionate.

Quale tecnica di analisi univariata è stata adoperata l’ANOVA ad 1 fattore con *test post hoc* per confronti multipli tra medie (*Tukey test*).

I dati sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica ($\log x+1$) prima di essere sottoposti alle summenzionate analisi, ad eccezione della MRPP che è una tecnica utilizzabile anche per *dataset* non mostranti una distribuzione normale.

Vale la pena sottolineare che la DCA è una tipica analisi di gradiente indiretto concepita inizialmente per la valutazione dei cambiamenti in specie in risposta al discostamento dei fattori limitanti dai relativi *optima* biologici (Hill & Gauch, 1980).

Tuttavia non vi sono motivi particolari che ostano la sua applicazione su altri tipi di dataset (Rodó *et al.*, 2002; Escudero *et al.*, 2003; PC-ORD 4 – User Guide, 1999). Ovviamente, in tal caso, il senso del gradiente analizzato si modifica in quanto esso non può più esprimere il tasso di variazione di una specie.

Nel caso del presente lavoro è stato inteso che esso indicasse il tasso di variazione dei parametri ecofisiologici analizzati come risposta ad uno o più eventuali gradienti di fattori ambientali.

A valle dell’esecuzione della DCA è stata effettuata un’analisi di correlazione tra le distanze di ordinazione e quelle nello spazio originale ed il calcolo del relativo coefficiente di determinazione ha messo in evidenza che la maggior parte della variazione dei dati è associabile al primo asse (90,01%), per cui l’individuazione di raggruppamenti stagionali, relativi a valori omogenei di parametri ecofisiologici, va fatta pressoché esclusivamente in relazione a questo.

Alla luce di ciò sono stati rilevati 4 gruppi opportunamente evidenziati nel diagramma di ordinazione (Fig. 3.29). Si può inoltre osservare che la stazione 3D, sita in corrispondenza della sede ANAS di Castrovillari, segrega completamente dalle altre non risultando associabile a nessun raggruppamento.

Il dendrogramma risultante dall’analisi di classificazione (Fig. 3.30) mostra sia lo sviluppo di 3 *macroclusters* che, con buona approssimazione, coincidono con i raggruppamenti derivanti dalla DCA sia la presenza di una percentuale di “*chaining*” (5,23%) piuttosto bassa che consolida il risultato dell’analisi.

Dal momento che, come detto in precedenza, nessuno dei due summenzionati tipi di analisi contempla un test di significatività, al fine di valicare in maniera efficace tale risultato è stata eseguita una *Multi Response Permutation Procedure* (MRPP) sullo stesso *dataset* sul quale sono state realizzate la DCA e la *Cluster Analysis*.

Il risultato è mostrato in tabella 3.12.

| MRPP |
|--|
| Test statistic: $T = -17.454960$ |
| Observed delta = $0.54262185E-01$ |
| Expected delta = $0.90195590E-01$ |
| Variance of delta = $0.42379813E-05$ |
| Skewness of delta = -1.2517895 |
| Chance-corrected within-group agreement, $A = 0.39839425$ |
| $A = 1 - (\text{observed delta}/\text{expected delta})$ |
| $A_{\max} = 1$ when all items are identical within groups ($\text{delta}=0$) |
| $A = 0$ when heterogeneity within groups equals expectation by chance |
| $A < 0$ with more heterogeneity within groups than expected by chance |
| Probability of a smaller or equal delta, $p = 0.00000000$ |

Tabella 3.12 – Risultato della MRPP eseguita su *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al primo trapianto lichenico.

Sia l'effetto ($A = 0,398$) appare molto elevato che il valore di δ appare estremamente significativo suggerendo con evidenza che è possibile individuare 3 raggruppamenti stazionali omogenei per quanto attiene il complesso di parametri ecofisiologici analizzato.

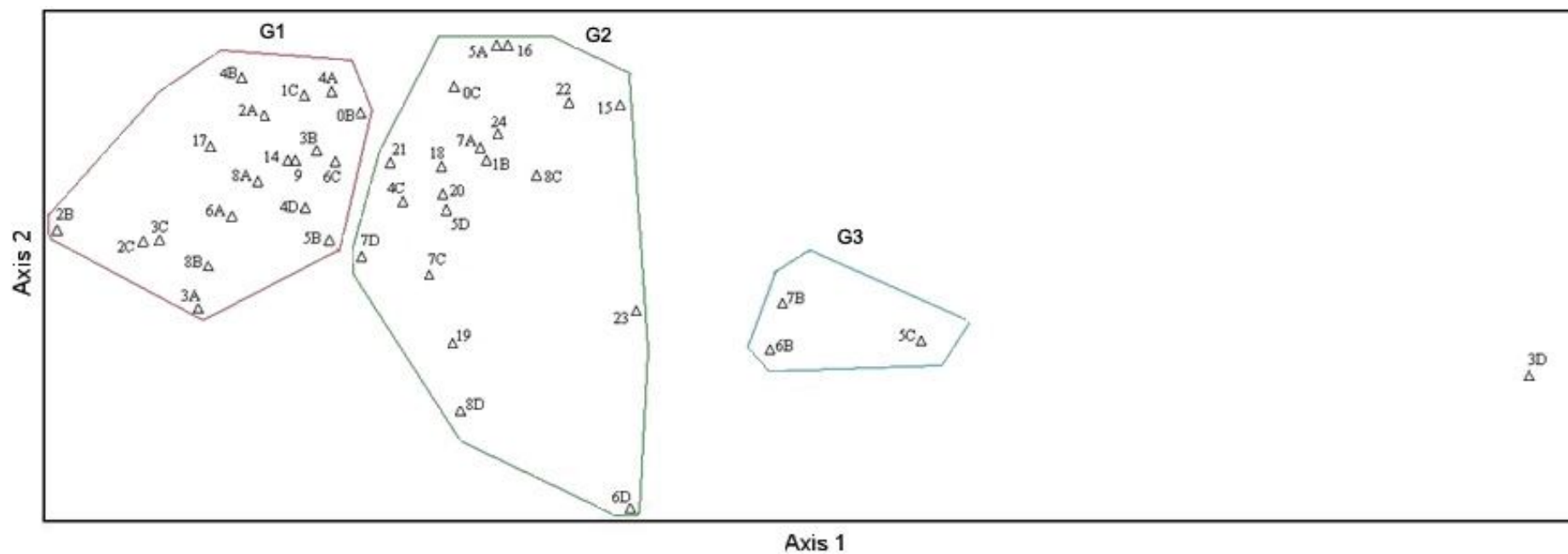


Figura 3.29 – Diagramma di ordinazione ottenuto eseguendo una DCA sul *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al primo trapianto lichenico nell'area di studio (maggio 2010 - luglio 2010).

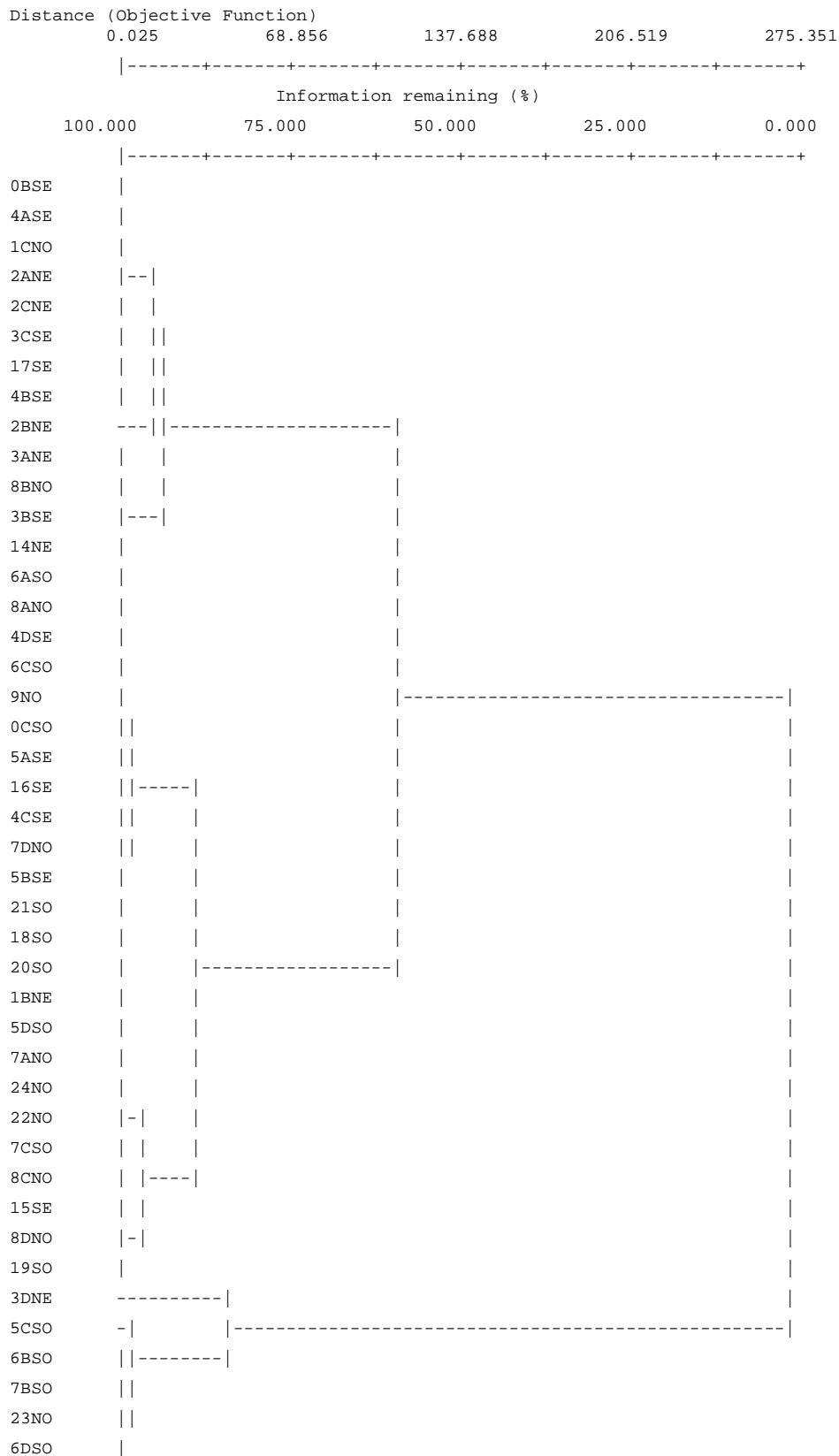


Figura 3.30 – Dendrogramma ottenuto dalla *Cluster Analysis* eseguita sul *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al primo trapianto lichenico nell’area di studio (maggio 2010 - luglio 2010).

Al fine di verificare il discostamento, in termini di parametri ecofisiologici, delle stazioni site nell'area di monitoraggio da quella di riferimento (La Fossiateda), risultando quest'ultima una condizione non replicata (assenza di più siti di riferimento), i valori dei parametri relativi a ciascun raggruppamento sono stati "rankizzati" e messi a confronto con quelli del sito "sorgente" dei talli lichenici per verificare quanti di essi risultassero rispettivamente superiori od inferiori a quelli del riferimento (Tab. 3.13).

| PRIMO TRAPIANTO | | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|--------|----------|----------|-------------------|-----------|
| Gruppi | E.C.% | A492 | Fv/Fm | TBA RS | Clo''a'' | Clo''b'' | Xan + β Car | A435/A415 |
| 1 | 17/21 | 17/21 | 11/21 | 9/21 | 2/21 | 2/21 | 2/21 | 19/21 |
| 2 | 21/22 | 19/22 | 5/22 | 17/22 | 1/22 | 1/22 | 1/22 | 1/22 |
| 3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| 4 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 |

Tabella 3.13 – Quota di stazioni che mostrano un valore superiore a quello del sito di riferimento per ciascun parametro ecofisiologico relative al primo trapianto lichenico.

Appare evidente dalla tabella 3.13 che:

- la maggior parte dei valori relativi ai pigmenti (clorofille, xantofille e carotenoidi) sono sempre inferiori a quelli di riferimento,
- quelli del coefficiente di feofitinizzazione e dell'efficienza fotosintetica risultano superiori ai valori dell'area sorgente, ma di scarso significato ecologico in quanto sempre prossimi a valori fisiologici (Bačkor & Loppi, 2009),
- quelli delle sostanze TBA reattive, della conducibilità elettrica e dell'attività deidrogenasica sono, nella maggior parte dei casi, superiori a quelli di riferimento.

Successivamente è stata verificata la possibile differenza, in termini di singoli parametri ecofisiologici, esistente tra i tre raggruppamenti stagionali individuati (per individuare a quali di questi siano ascrivibili primariamente le differenze rilevate dalla MRPP) e ciò è stato realizzato eseguendo un'Analisi della Varianza ad 1 via usando quale fattore nuovamente quello "Gruppi" ed un *Tukey test* per i confronti multipli tra medie dopo avere normalizzato i dati a seguito di trasformazione logaritmica ($\log x+1$).

La tabella 3.14 mostra la significatività (p) per il valore di "F" ed i confronti tra medie (gruppi) che risultano statisticamente significativi.

| <i>Parametri ecofisiologici</i> | <i>F</i> | <i>p</i> | <i>C.S.S. ($p < 0,05$)</i> |
|---------------------------------|----------|----------|--|
| EC% | 2,47 | 0,098 | ---- |
| TBA RS | 6,17 | 0,005 | G2>G1 |
| A492 | 0,07 | 0,934 | ---- |
| Fv/Fm | 1,73 | 0,191 | ---- |
| Clo"a" | 8,34 | 0,001 | G1> G2 e G3 |
| Clo"b" | 6,22 | 0,005 | G1> G2 e G3 |
| Xan + β Car | 6,65 | 0,003 | G1> G2 e G3 |
| A435/A415 | 67,4 | 0,000 | G1> G2 e G3 |

Tabella 3.14 – Risultato dell'ANOVA ad 1 via eseguita sui parametri ecofisiologici tra raggruppamenti stazionali individuati con l'analisi multivariata (G = Gruppo), (C.S.S.= Confronti tra mediane Statisticamente Significativi).

L'ANOVA risulta significativa per tutti i pigmenti e le sostanze TBA reattive.

Per quanto attiene ai confronti tra i gruppi, nel caso dei pigmenti, il Gruppo 1 (sito prevalentemente nel settore orientale dell'area di studio rispetto alla cemenzeria che viene considerata come spartiacque geografico per la definizione dei relativi quadranti dell'area di studio) appare sempre superiore, in maniera statisticamente significativa, ai Gruppi 2 e 3 (collocati in prevalenza nel settore occidentale dell'area di studio).

Al contrario, le sostanze TBA reattive risultano sempre superiori, in maniera statisticamente significativa, nel Gruppo 2 (sito prevalentemente nel settore occidentale) rispetto a quello 1. Incrociando i risultati delle due analisi si possono eseguire le seguenti considerazioni.

L'osservazione del numero delle stazioni con valori dei parametri superiori od inferiori al bianco conferma quanto già suggerito dai valori di tendenza centrale (mediane) utilizzati nella disamina del *trend* temporale degli stessi, ovvero che, siccome la maggior parte delle stazioni, a prescindere dai gruppi individuati, mostrano valori dei parametri ecofisiologici inferiori (pigmenti) o superiori (TBA rs, E.C.% e A492) rispetto all'area sorgente, appare più probabile ritenere che tale differenza sia ascrivibile ad un fattore quale il clima, per il quale è acclarato il suo discostarsi dalle richieste ecologiche di *Pseudevernia furfuracea*, che agisca su macroscale, piuttosto che fattori su scala locale quali le differenti sorgenti antropiche presenti nell'area di studio. Ovviamente tale interpretazione, come detto in precedenza, non ne esclude

altre, ad esempio la presenza di un inquinamento diffuso in tutta l'area che, tuttavia, appare meno probabile anche alla luce della fase stagionale che dovrebbe promuovere una più efficace dispersione di inquinanti atmosferici.

Tra i gruppi stazionali individuati sono rinvenibili delle differenze significative tra i pigmenti (il versante orientale mostra valori medi decisamente superiori a quello occidentale) ed i livelli di sostanze TBA reattive (versante occidentale > versante orientale), suggerendo con evidenza la presenza di fattori su scala locale che diversificano il *trend* su macroscala (a livello dell'intera area di studio).

Tale risultato, inoltre, trova anche un certo riscontro, come visto in precedenza, dall'osservazione delle carte di isoconcentrazione, che sottolineano una relativa sovrapposizione tra le aree di criticità dei pigmenti e quelle delle sostanze TBA reattive.

Una possibile interpretazione di tale scenario può essere la seguente: a fronte di una generale depressione dei valori di pigmenti (determinata dai valori sfavorevoli di temperatura), il versante orientale risulta più vicino alla fascia agricola che, presumibilmente, determina immissione nell'area di studio di composti azotati (Figg. 3.7 e 3.8), i quali promuovono l'attività fotosintetica (Hauck, 2010; Frati *et al.*, 2010; Ra *et al.*, 2005) (compensando parzialmente l'azione negativa legata allo stress termico).

Il versante occidentale, d'altro canto, non solo probabilmente risente di meno dell'effetto "fertilizzante" derivante dalle attività agricole (per la maggiore distanza da esse), ma anche potrebbe essere influenzato negativamente dalla prossimità con l'area industriale di Castrovillari o con le altre sorgenti "locali" di inquinanti atmosferici (cava, depositi abusivi di pneumatici, discariche incontrollate di materiali di natura eterogenea, maggiore vicinanza all'area urbana di Castrovillari) che, risultando collocate prevalentemente nel settore occidentale dell'area di studio, potrebbero contribuire all'incremento dei livelli di sostanze TBA reattive misurati.

3.6.2 Terzo trapianto lichenico (novembre 2010 - gennaio 2011)

Nel trimestre novembre 2010 - gennaio 2011 non solo il differenziale tra i valori di temperatura ed umidità relativi alle aree di La Fossia e Castrovillari tende a ridursi, ma anche, nel caso dell'area di studio, il primo parametro si attesta su valori ampiamente al di sotto della soglia di stress termico denotando così la presenza di condizioni climatiche più che idonee alle richieste ecologiche della specie *Pseudevernia furfuracea*.

I talli lichenici esposti in tale periodo hanno mostrato lo sviluppo di un sensibile bioaccumulo per molti dei metalli pesanti analizzati, raggiungendo alcuni di essi, come sottolineato trattando della loro variazione temporale, valori di concentrazione che i dati

di letteratura associano spesso alla presenza di fenomeni di industrializzazione e/o urbanizzazione.

Al fine di ottenere una georeferenziazione dei suddetti valori critici di concentrazione, nell'ambito del distretto territoriale monitorato, il *dataset* ad essi relativo è stato elaborato con il pacchetto di programmi SURFER della Golden Software Inc. (Colorado, USA), per l'ottenimento di carte su scala 1:25.000 mostranti le aree ad isoconcentrazione dei metalli ritenuti potenzialmente più critici dal punto di vista della contaminazione ambientale (Allegato II).

L'osservazione delle fasce di isoconcentrazione va effettuata tenendo presente che, mentre ferro, calcio e magnesio nella quasi totalità dei siti di monitoraggio raggiungono valori di concentrazione associabili a situazioni di marcata antropizzazione territoriale (Tab. 3.1), gli altri metalli si attestano in una condizione analoga solo tra il 30% ed il 50% delle stazioni ad eccezione del rame che manifesta livelli alquanto critici in 7 stazioni su 61. Ciò significa che la lettura delle carte per ferro, calcio e magnesio va intesa come sviluppo differenziale di livelli di una condizione di contaminazione a scala generale, ovvero riguardante l'intera area di studio, mentre per manganese, alluminio, sodio e vanadio essa deve essere considerata come una zonazione tra fasce territoriali sottoposte a contaminazione e fasce territoriali presumibilmente poco o affatto sottoposte a contaminazione.

In generale la distribuzione delle fasce di concentrazione appare coerente sia con la collocazione territoriale delle principali sorgenti antropiche di inquinanti atmosferici, site essenzialmente ad ovest della cementeria, sia con la direzione prevalente dei venti che, nel trimestre in oggetto, spirano con una frequenza di circa il 40% sul totale dei casi da nord/nord-ovest, risultando i livelli critici o sub - critici di concentrazione, per tutti i metalli prevalentemente collocati nei quadranti di nord-ovest, sud-ovest e sud-est e pressoché mai in quello di nord-est.

A tale risultato potrebbe contribuire anche la conformazione del territorio vista la presenza dei rilievi montuosi del massiccio del Pollino a ridosso dei centri di Frascineto ed Eianina nel quadrante di nord-est, fattore che da un lato favorisce l'incanalamento dei venti prevalenti verso sud-est e dall'altro, per il sollevamento delle masse d'aria riscaldate a ridosso dei versanti montuosi, determina la formazione di correnti di risalita (Conway & Maryland Space Grant Consortium, 1997) che probabilmente allontanano gli inquinanti.

A tale tipo di approccio ne è stato affiancato anche un secondo, utilizzando tecniche statistiche di analisi multivariata e univariata applicate all'intero *dataset* di metalli pesanti. Nel primo caso sono state utilizzate la PCA (*Principal Component Analysis*), la DCA (*Detrended Correspondence Analysis*), l'NMS (*Non Metric*

Multidimensional Scaling) e la *Cluster Analysis*. Nessuna di queste analisi di ordinazione e classificazione si è rilevata adeguata nell'interpretare in maniera efficace la variazione dei dati di concentrazione stazionale restituendo una razionale descrizione di *trend* spaziali associabili alle caratteristiche del territorio in termini di antropizzazione, topografici e climatici.

Nel secondo caso è stata utilizzata un'analisi della Varianza non parametrica ad 1 via (*Kruskall – Wallis*) con *test post hoc* per il confronto multiplo di mediane (*Nemeneyi test*) scegliendo quale criterio di fattorializzazione i “quadranti geografici” (NO, SO, SE, NE) in cui l'area di studio è stata divisa utilizzando la cementeria quale punto di intersezione teorico tra gli assi di delimitazione dei quadranti stessi. Anche in tal caso l'ANOVA è stata applicata a tutti i metalli presi in esame.

Nella tabella 3.15 sono riportati i dati relativi a quei metalli che presentano delle differenze di concentrazioni tra i versanti statisticamente significative.

| Metalli | H | p | C.S.S. |
|----------------|----------|----------|---------------------|
| Mg | 10,17 | 0,017 | SO>NE |
| Ca | 10,19 | 0,017 | SO>NE; SE>NE |
| V | 10,49 | 0,015 | SO>NE; NO>NE |
| Cr | 13,82 | 0,003 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| Mn | 8,48 | 0,037 | SE>NE |
| Fe | 8,26 | 0,041 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| Co | 8,74 | 0,032 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| Cu | 9,04 | 0,029 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| As | 48,41 | 0,038 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| Cd | 10,66 | 0,014 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |
| Sb | 10,60 | 0,014 | SO>NE; SE>NE; NO>NE |

Tabella 3.15 – Risultati dell'ANOVA parametrica ad 1 via e relativo *test post hoc* (*Nemeneyi test*) per la valutazione dei confronti tra mediane statisticamente significativi eseguita sulle mediane delle concentrazioni dei metalli misurati nei talli di *Pseudevernia furfuracea* trapiantati nell'area di studio nel trimestre novembre 2010 - gennaio 2011 (C.S.S.= Confronti tra mediane Statisticamente Significativi).

Tra i metalli che sviluppano picchi di concentrazioni associabili a fenomeni di contaminazione da industrializzazione/urbanizzazione del territorio ferro e rame mostrano valori più elevati nei quadranti di NO, SO e SE rispetto a quello di NE in accordo con quello ottenuto con le carte di isoconcentrazione; il calcio mostra differenze statisticamente significative tra i quadranti di SO e SE rispetto a quello di NE

ed il magnesio tra quello di SO e NE. Tra gli altri metalli il vanadio si comporta come il calcio ed i rimanenti elementi come ferro e rame, supportando la conclusione tratta in precedenza dall'analisi delle carte, per cui la distribuzione spaziale della concentrazione dei metalli nei talli esposti appare coerente con la disposizione delle potenziali sorgenti territoriali di inquinanti e l'andamento dei venti in relazione alle caratteristiche climatiche e topografiche dell'area indagata.

Considerando la dimensione e l'altezza del camino della cementeria, e quindi l'estensione potenziale delle traiettorie di deposizione delle sostanze emesse, la direzione dei venti prevalenti, la pressoché sistematica presenza di picchi di criticità delle concentrazioni di ferro e calcio in tutta l'area di studio, la loro rappresentatività non solo nei materiali per la produzione del cemento ma soprattutto nelle emissioni, la bontà della corrispondenza dei loro rapporti tra concentrazioni nelle emissioni e concentrazioni nei talli, si può ragionevolmente sostenere che l'attività di manifattura del cemento abbia contribuito in maniera significativa alla contaminazione ambientale dovuta a queste sostanze.

Simili considerazioni si possono fare anche in relazione a magnesio, alluminio e manganese visto il loro livello di diffusione ambientale, il numero rilevante di picchi di criticità di concentrazione e la buona corrispondenza dei loro rapporti con calcio e ferro tra le emissioni da cementifici che utilizzano tipologie di combustibile paragonabile a quello dichiarato dall'ITALCEMENTI per l'impianto di Castrovillari e quelli misurati nei talli lichenici esposti nell'area sottoposta a monitoraggio. Tra di essi, l'alluminio ed il manganese sono dei traccianti meno sistematici dell'attività di un cementificio rispetto a calcio e ferro, mentre il magnesio, vista la natura dei materiali litici necessari alla produzione della miscela, appare di peso equivalente a questi ultimi due.

Per quanto attiene il problema della potenziale esposizione delle popolazioni residenti ai contaminanti atmosferici rilevati dal biomonitoraggio va premesso che, data la modalità di indagine seguita, non è possibile effettuare delle estrapolazioni delle concentrazioni atmosferiche dei metalli rilevati.

Tuttavia, uno studio volto a verificare la correlazione tra concentrazione di metalli in trapianti lichenici e l'incidenza di malattie respiratorie nei bambini (Carreras *et al.*, 2009), ha rilevato la presenza di una correlazione statisticamente significativa tra ferro e manganese e numerose patologie quali faringiti, tonsilliti, asma, laringiti e riniti allergiche, a concentrazioni nei talli sensibilmente inferiori a quelle da noi rilevate e tale dato potrebbe risultare alquanto significativo se si pensa che tali metalli raggiungono picchi di criticità di concentrazioni proprio in corrispondenza del centro di Frascineto.

Più in generale, l'esposizione cronica a polveri alcaline per la presenza di sodio e/o calcio^[9] (Gomez, 1992) genera: irritazioni nasali e delle prime vie respiratorie, rush cutanei, processi infiammatori e dermatiti.

I dati relativi ai parametri ecofisiologici sono stati sottoposti allo stesso *iter* analitico seguito nel caso dei metalli pesanti ovvero, produzione di carte di isoconcentrazione (Allegato III), ed esecuzione di tecniche di analisi multivariata ed univariata per supportare o, eventualmente migliorare con evidenze statistiche, le indicazioni derivanti dalle carte.

L'osservazione delle carte mette in evidenza una certa corrispondenza tra quelle inerenti clorofilla "a", clorofilla "b", xantofille + carotenoidi, sostanze TBA reattive e conducibilità elettrica. Paragonabile, ma meno sovrapponibile, risulta l'andamento della respirazione cellulare.

Le aree di maggiore criticità di questi parametri si collocano in corrispondenza della cimiteria o in adiacenza ad essa con prevalenza marcata dei versanti di SO e SE. Differente, invece, appare la dimensione (maggiore) e la collocazione delle fasce di isoconcentrazione del coefficiente di feofitinizzazione e dell'efficienza fotosintetica che, come già detto in precedenza, solo in un numero molto limitato di stazioni si attestano su valori che chiaramente si discostano da quelli di talli collocati in aree in assenza di contaminazione.

Anche nel caso dei parametri ecofisiologici le tecniche di analisi multivariata prescelte sono state una di ordinazione (*Detrended Correspondence Analysis*) ed una di classificazione (*Cluster Analysis*) in quanto risultanti le più performanti nel descrivere la maggiore quota di variazione associata al *dataset* in esame.

La figura 3.31 mostra lo "scattergram" ottenuto dall'applicazione della DCA.

Poiché il coefficiente di determinazione ottenuto dall'analisi di correlazione tra le distanze di ordinazione e quelle nello spazio originale suggerisce con evidenza che la quasi totalità della variazione risulta associata al primo asse (97,1%), appare ovvio che l'eventuale presenza di discontinuità tra la sequenza di stazioni presente nel diagramma va ricercata lungo tale asse, un'operazione che ha permesso di evidenziare 4 raggruppamenti oltre a 2 stazioni (2B ed 8B) palesemente isolate rispetto alle altre, nonché sensibilmente distanti tra di loro (ovvero non formanti un ulteriore gruppo).

La *Cluster Analysis* (Fig. 3.32) caratterizzata da una percentuale di "chaining" estremamente bassa (1,83%) ha evidenziato la formazione di 4 *macroclusters*, due dei quali ulteriormente scomposti in *clusters* più piccoli e la disamina delle stazioni ad essi appartenenti ha in buona misura confermato l'assetto compositivo dei gruppi presenti nel diagramma di ordinazione.

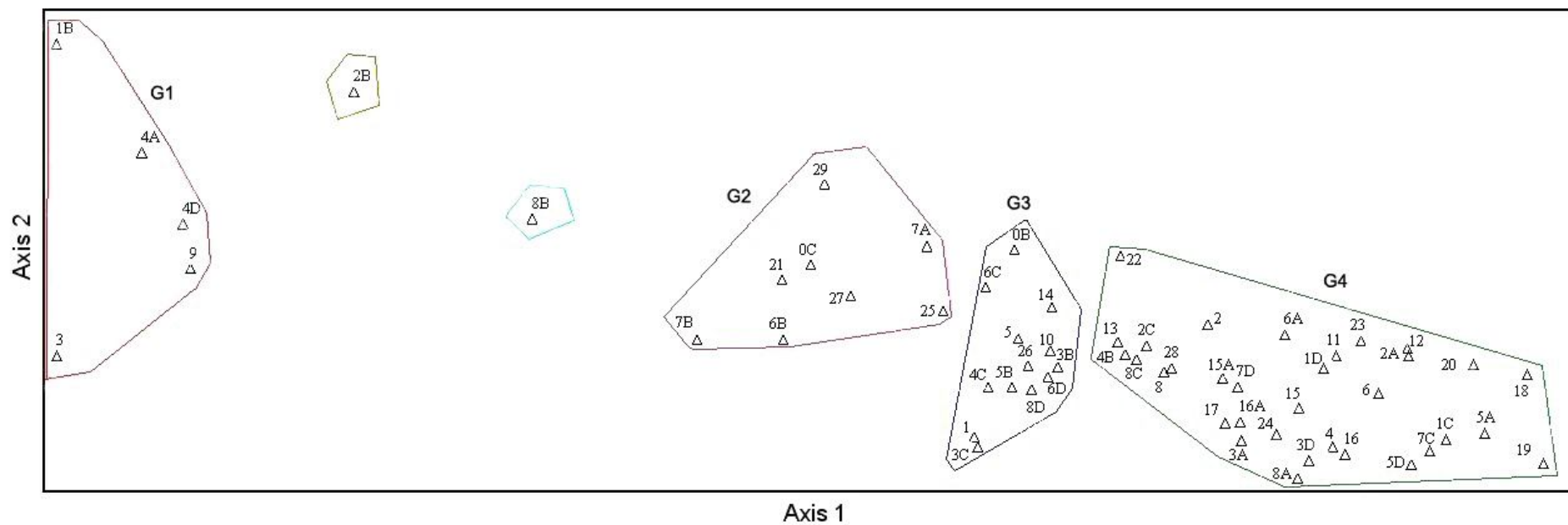


Figura 3.31 – Diagramma di ordinazione ottenuto eseguendo una DCA sul *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al terzo trapianto lichenico nell'area di studio (novembre 2010 - gennaio 2011).

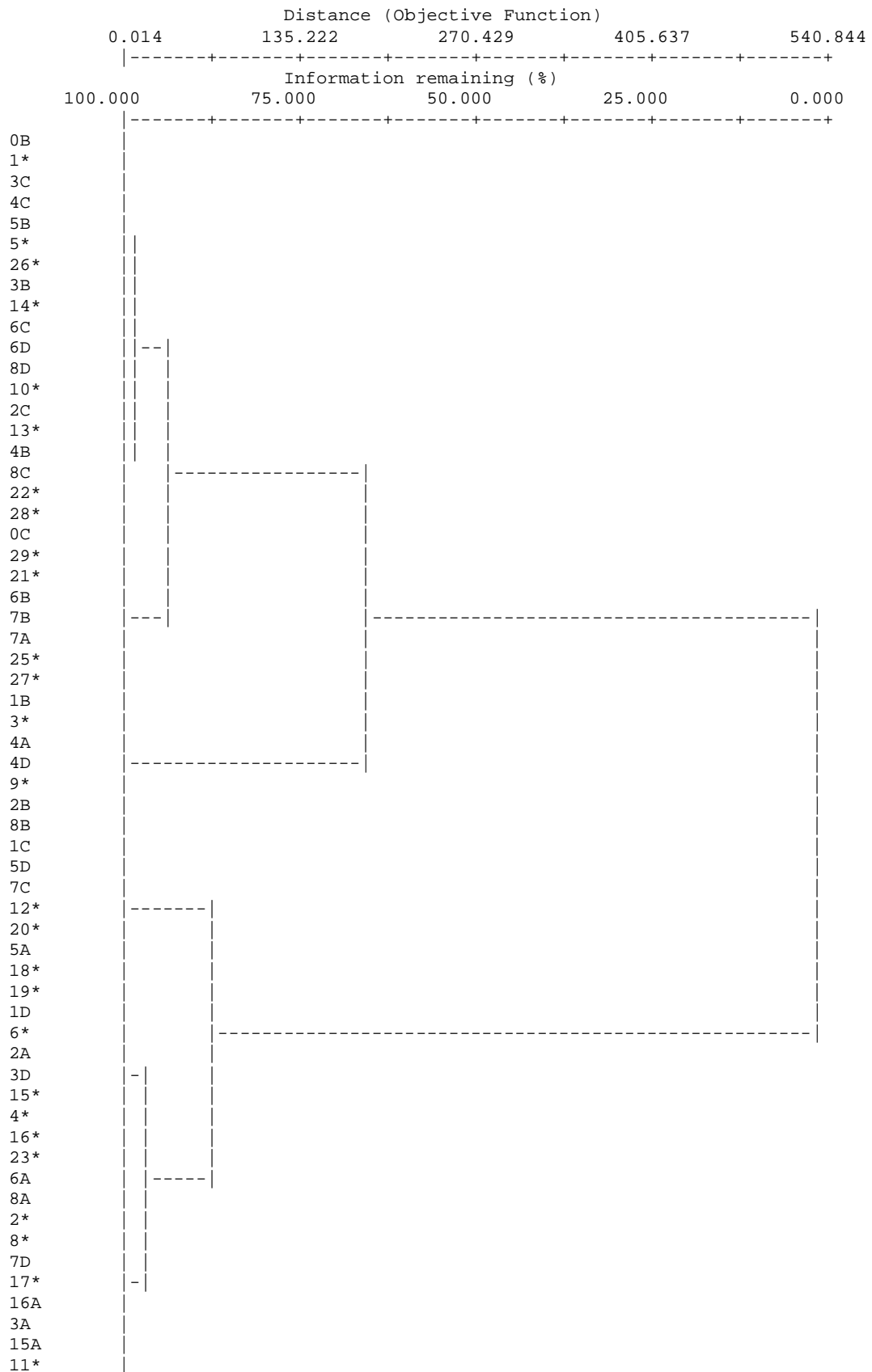


Figura 3.32 – Dendrogramma ottenuto dalla *Cluster Analysis* eseguita sul *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al terzo trapianto lichenico nell'area di studio (novembre 2010 - gennaio 2011).

Ai fini di validare statisticamente la presenza di tali raggruppamenti stagionali è stata nuovamente eseguita sul dataset originale una *Multi Response Permutation Procedure* (MRPP) per testare l'effetto della variazione del fattore "Gruppi" su quella dell'insieme dei parametri ecofisiologici presi in esame.

Il risultato è mostrato nella tabella 3.16.

| MRPP |
|---|
| Test statistic: $T = -19.179103$ |
| Observed delta = $0.82238442E-01$ |
| Expected delta = 0.13549057 |
| Variance of delta = $0.77093424E-05$ |
| Skewness of delta = -1.1616008 |
| Chance-corrected within-group agreement, $A = 0.39303198$ |
| $A = 1 - (\text{observed delta}/\text{expected delta})$ |
| Amax = 1 when all items are identical within groups (delta=0) |
| A = 0 when heterogeneity within groups equals expectation by chance |
| A < 0 with more heterogeneity within groups than expected by chance |
| Probability of a smaller or equal delta, $p = 0.00000000$ |

Tabella 3.16 – Risultato della MRPP eseguita sul *dataset* di parametri ecofisiologici relativi al terzo trapianto lichenico.

Ancora una volta l'effetto appare molto elevato come indicato dal valore di "A" superiore a 0,3 (McCune & Grace, 2002) con un valore di "p" associato a quello del parametro statistico calcolato " δ " ampiamente al di sopra della soglia di significatività statistica.

Avendo così corroborato l'ipotesi della presenza di quattro raggruppamenti stagionali, nell'ambito dell'area di studio, omogenei per valori dei parametri ecofisiologici, si è proceduto alla verifica di un eventuale discostamento di questi dalle condizioni di riferimento (area sorgente, località La Fossata) come pure del numero e tipo di parametri ai quali associare le differenze evidenziate dalla MRPP.

La tabella 3.17 mostra, per singolo parametro e per raggruppamento, il numero di stazioni che hanno un valore superiore a quello del bianco.

| TERZO TRAPIANTO | | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------------------|-----------|
| Gruppi | E.C.% | A492 | Fv/Fm | TBA RS | Clo"a" | Clo"b" | Xan + β Car | A435/A415 |
| 1 | 3/5 | 1/5 | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 6/8 | 1/8 | 5/8 | 8/8 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 2/8 |
| 3 | 9/13 | 2/13 | 12/13 | 13/13 | 0/13 | 0/13 | 0/13 | 0/13 |
| 4 | 29/33 | 10/33 | 32/33 | 32/33 | 3/33 | 3/33 | 3/33 | 33/33 |
| 5 | 0/2 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |

Tabella 3.17 – Quota di stazioni che mostrano un valore superiore a quello del sito di riferimento per ciascun parametro ecofisiologico relativa al terzo trapianto lichenico.

I pigmenti e la conducibilità di membrana mostrano una situazione abbastanza equivalente al primo trapianto laddove i livelli di sostanze TBA reattive e la respirazione cellulare presentano un ulteriore peggioramento rispetto al bianco in termini di numero di stazioni con valori rispettivamente superiori ed inferiori ad esso.

Il coefficiente di feofitinizzazione e soprattutto l'efficienza fotosintetica, pur presentando entrambi un numero elevato di stazioni con valori inferiori a quelli del bianco, si mantengono in un *range* denotante assenza di patologia cellulare (Bačkor & Loppi, 2009). Risultando i dati normalizzati a seguito di trasformazione logaritmica, come nel caso del primo trapianto, essi sono stati sottoposti ad Analisi della Varianza parametrica ad 1 via con *test post hoc* per confronti multipli tra medie (*Tukey test*).

I risultati sono illustrati nella tabella 3.18.

| Parametri ecofisiologici | F | p | C.S.S. ($p < 0,05$) |
|--------------------------|-------|-------|-----------------------|
| EC% | 0,22 | 0,885 | --- |
| TBA RS | 1,66 | 0,186 | --- |
| A492 | 0,80 | 0,500 | --- |
| Fv/Fm | 4,07 | 0,011 | G2,G3,G4>G1 |
| Clo"a" | 16,12 | 0,000 | G4>G1,G2,G3 G3>G2 |
| Clo"b" | 11,41 | 0,000 | G4>G1,G2,G3 G3>G2 |
| Xan + β Car | 14,51 | 0,000 | G4>G1,G2,G3 G3>G2 |
| A435/A415 | (*) | | |

Tabella 3.18 – Risultato dell'ANOVA ad 1 via eseguita sui parametri ecofisiologici tra i gruppi di stazioni individuati con l'analisi multivariata: (G = Gruppo), (*) ANOVA non eseguita in quanto i dati hanno mostrato un valore di $p < 0,05$ nel test di Eguaglianza delle Varianze, (C.S.S.= Confronti tra mediane Statisticamente Significativi).

Il risultato più interessante appare quello relativo ai pigmenti in quanto indica che tre dei quattro gruppi differiscono in maniera statisticamente significativa rispetto al quarto. La maggior parte delle stazioni afferenti a questi 3 gruppi si localizzano nella zona in cui sono presenti l'area industriale di Castrovillari, la cementeria, un tratto dell'autostrada A3 ed i centri di Eianina e Frascineto, ovvero il distretto territoriale ove risulta massima la concentrazione di attività antropiche potenzialmente impattanti sulle caratteristiche dell'atmosfera.

Delle stazioni del quarto gruppo 1/3 risulta frammisto alle precedenti e 2/3 si collocano esternamente alla zona ove si concentrano quelle degli altri tre gruppi.

Dalla comparazione dei dati relativi alla contaminazione spaziale da metalli pesanti con quella della distribuzione territoriale dei livelli di alterazione dei parametri ecofisiologici (nonché in base alle analisi di correlazione tra metalli e parametri ecofisiologici), si può avanzare l'ipotesi per cui, in tale trimestre, tutta l'area di studio abbia sviluppato uno stato di compromissione ambientale, sebbene, al suo interno, sia possibile individuare una zona coincidente con quella di massima antropizzazione ed incidenza delle attività industriali, di più elevata criticità.

In aggiunta, la sub - zona associata all'area industriale di Castrovillari (Gruppo 2) e sita ad ovest/sud-ovest della cementeria, potrebbe rappresentare un picco di ulteriore criticità in quanto i livelli dei pigmenti appaiono depressi rispetto a quelli delle stazioni del Gruppo 1.

È significativo che a tale differenza non se ne associ una sottoforma di sostanze TBA reattive, il che suggerisce che lo scarto in termini di concentrazioni di pigmenti (tra le due sub - zone primarie dell'area di criticità), non sia riconducibile ad un meccanismo mediato dalla formazione di radicali dell'ossigeno. Ciò potrebbe spiegarsi con il fatto che alcuni metalli si caratterizzano anche per meccanismi di danno diversi dalla formazione di specie radicaliche e/o, come già ipotizzato più volte, con la presenza di altri inquinanti non monitorati nel presente lavoro (o una loro interazione).

D'altro canto a questa zona dell'area di studio (intesa come versante occidentale) già nel corso del primo trapianto risultava associato un gruppo stazionario mostrante una diminuzione della concentrazione dei pigmenti (rispetto alle altre stazioni site in prevalenza nel versante orientale della griglia di campionamento) ed un incremento del danno da perossidazione lipidica (che, in tale circostanza, potrebbe essere stata in relazione causale con la riduzione dei pigmenti), il che la candida ad essere un distretto frequentemente esposto all'azione di sostanze inquinanti di varia natura.

3.6.3 Quarto trapianto lichenico (febbraio 2011 - aprile 2011)

In analogia a quanto rilevato nel caso del primo trapianto anche nel quarto i talli non hanno mostrato nessun significativo processo di bioaccumulo e, dal momento che le condizioni climatiche dell'area di studio risultano analoghe a quelle del trimestre precedente (Figg. 3.5 e 3.6), è ragionevole pensare che il risultato ottenuto sia ascrivibile ad una marcata riduzione delle attività delle sorgenti locali di tali contaminanti atmosferici.

Anche in tale caso, quindi, non si è proceduto ad un'analisi della variazione spaziale dei metalli pesanti, visto il numero di casi estremamente ridotto in cui si evidenziavano valori di concentrazioni marcatamente superiori a quelle rilevate nell'area sorgente.

Il *dataset* dei parametri ecofisiologici è stato, invece, sottoposto alla stessa procedura analitica seguita nel caso del primo e del terzo trapianto ovvero, produzione di carte di isoconcentrazione, analisi multivariata ed univariata per esplorare la presenza di eventuali *trend* spaziali significativi degli indicatori di status fisiologico nell'ambito dell'area di studio.

L'osservazione delle carte di isoconcentrazione, nel caso della clorofilla "a", clorofilla "b" e delle xantofille + carotenoidi rileva, rispetto al trapianto precedente, una persistenza dell'area di criticità nel versante geografico ad ovest della cemeniteria. Un risultato che, ancora una volta, sottolinea come questo settore rappresenti una zona costantemente sottoposta all'azione di fattori di stress che si risolvono in una depressione dei livelli di pigmenti, in assenza di condizioni climatiche sfavorevoli e di concentrazioni critiche di metalli pesanti.

D'altro canto, come visto nell'analisi del *trend* temporale, si determina anche un miglioramento marcato del dato di tendenza centrale con valori che virtualmente sono equivalenti a quelli dei talli dell'area sorgente (clorofilla "a": + 0,0099%, Clorofilla "b": + 3,8%; Xantofille + Carotenoidi: + 2,6%), suggerendo che l'areale di compressione di tali parametri risulta marcatamente ridotto rispetto ai trimestri precedenti, probabilmente in risposta alla scomparsa di fattori penalizzanti (clima sfavorevole e contaminazione da metalli pesanti).

Prendendo in esame la carta di isoconcentrazione dei valori di conducibilità elettrica (Allegato III), essa mostra un residuo persistere di valori critici nei versanti di sud-est, sud-ovest (in maniera del tutto puntiforme) e di nord-ovest, ma l'area principale ora appare situata nel versante di nord-est, uno spostamento che sembra difficilmente riconducibile alle attività antropiche note nell'area di studio.

Esse, infatti, sono la bretella autostradale A3 alla quale è associabile un picco di ossidi di azoto nel bimestre luglio/agosto 2010 ed un picco secondario a dicembre 2010 che, tuttavia, si attesta su valori che non risultano problematici anche per una specie acidofila quale *Pseudevernia furfuracea* (Davies *et al.*, 2007) ed il nastro trasportatore che veicola il materiale grezzo dalla cava alla cementeria, le cui attività, molto verosimilmente, devono essere sensibilmente ridotte visto il mancato accumulo di metalli nei talli.

Come nel caso dei pigmenti, il valore di tendenza centrale della conducibilità elettrica si attesta su quello dei licheni dell'area sorgente (+ 1,4%), indicando un miglioramento dei livelli complessivi di tale parametro.

Anche l'analisi della carta di isoconcentrazione della respirazione (Allegato III), rileva la presenza di valori critici residui a cavallo della centrale e nei versanti di sud-est e nord-ovest. A fronte di un generale aumento dei valori del parametro, come ancora una volta denotano il dato di tendenza centrale e lo scarto rispetto al bianco (Figg. 3.24 e 3.27), si può notare il persistere di un certo numero di valori critici (marcatamente inferiori al bianco) nella fascia stazionale più esterna del versante di sud-est, unitamente a casi di assai lieve riduzione e a casi di aumento (rispetto al bianco). Contemporaneamente la clorofilla presenta una prevalenza di casi di incremento unitamente ad un numero più modesto di casi di leggero aumento, come pure di lieve ed elevata riduzione (rispetto al bianco).

Tale zona risulta sottoposta ad intenso sfruttamento agricolo ed i valori di azoto ammoniacale rilevano il raggiungimento di livelli che, come visto in precedenza, potrebbero essere dannosi per un lichene acidofilo quale *Pseudevernia furfuracea*.

Va osservato che, tuttavia, non esistono delle chiare indicazioni in letteratura circa il livello soglia di ammonio che potrebbe risultare nocivo per questa specie, ma solo casi in cui un danno appare manifesto a valori molto elevati di tale sostanza (Paoli *et al.*, 2010a).

La capacità di una specie lichenica di contrastare gli effetti tossici dell'ammonio dipende dai livelli di enzimi deidrogenasici deputati alla sua organizzazione (glutammina sintasi nel fotobionte e glutammato deidrogenasi nel micobionte), come pure dall'attivazione della fotosintesi attraverso un *Meccanismo di Concentrazione della CO₂* (CCM) che li mette in grado di aumentare l'efficienza fotosintetica (Palmqvist *et al.*, 1994). *Pseudevernia furfuracea*, al pari di altri licheni, possiede un fotobionte (*Trebouxia*) con un pirenoide nel cloroplasto dotato di un CCM (Smith & Griffiths, 1996), un elevato *pool* intracellulare di glutammina ed un'attività glutammato - deidrogenasi strettamente dipendente dal coenzima NADP(H) (Jager & Weigel, 1978); tuttavia essa, essendo una specie acidofila, come molte di queste (Gaio-Oliveira *et al.*,

2001), verosimilmente possiede un elevato numero di siti polianionici a livello della parete extracellulare del micobionte, risultando così in grado di accumulare elevati livelli di ammonio che, probabilmente, non riesce interamente a metabolizzare.

Premesso che non è stata rilevata alcuna correlazione (valori di "r" con $p > 0,05$) tra i valori di clorofilla e di assorbanza a 492 nm, misurati nei licheni collocati nei siti dotati di campionatori passivi ed i corrispondenti valori di concentrazione di ammonio (quindi un sub - campione relativamente limitato dell'intera area di studio), volendo comunque ipotizzare un concorso dell'ammonio alla variazione dei parametri rilevata (laddove non si abbia anche il contributo di altri inquinanti non presi in esame), quest'ultima si potrebbe in via ipotetica interpretare come una risposta del lichene sotto forma di un relativo incremento dei livelli di clorofilla accompagnato, non sempre adeguatamente, dall'organizzazione dell'ammonio.

Sebbene sia stato dimostrato negli organismi animali il ruolo inibitore dell'ammonio a carico di alcuni enzimi deidrogenasici mitocondriali (Lai & Cooper, 1991), tuttavia negli organismi vegetali esistono evidenze di segno opposto (Matsumoto *et al.*, 2006) e, più in generale, non sono ancora ben definiti i meccanismi biochimici tramite i quali un eccesso di ammonio risulta tossico per le piante (Britto & Kronzucker, 2002). In aggiunta è noto che numerosi pesticidi possono inibire l'attività degli enzimi che sono coinvolti nel metabolismo dell'azoto ammoniacale nei vegetali (Osuji *et al.*, 1999; Stenersen, 2004), un'eventualità non del tutto remota nel nostro caso visto l'intenso tasso di attività agricole della zona.

In fine anche la complessità topografica del territorio potrebbe avere ulteriormente contribuito a tale risultato determinando, su scala locale, concentrazioni disomogenee di ione ammonio.

I livelli di sostanze TBA reattive presentano solo un'area molto limitata di criticità che si sovrappone a quella precedente nel settore ad est della cemenzeria, mentre gli areali più estesi, comprendenti i valori più elevati, si collocano prevalentemente nel quadrante di sud-ovest a ridosso del centro di Castrovillari e, più limitatamente, in quello di sud-est nell'ambito della fascia ad intenso sfruttamento agricolo. Se, in alcuni casi, si potrebbe coinvolgere in tale esito il raggiungimento di eccessivi livelli di ammonio, in altri appare problematico ipotizzare la natura di un fattore casuale che dovrebbe ricondursi, come ipotizzato in precedenza, alla presenza di altri contaminanti la cui natura rimane ignota.

Quest'ultimo aspetto appare particolarmente critico soprattutto se si tiene presente che il valore di tendenza centrale misurato, pur risultando più basso di quello precedente e, quindi, denotando una riduzione complessiva dello stress ossidativo

nell'ambito dell'area di studio, tuttavia, appare significativamente più elevato rispetto al primo trapianto, suggerendo il persistere di un livello di fattori di stress sensibile.

I commenti per il coefficiente di feofitinizzazione e per il rapporto Fv/Fm possono ritenersi equivalenti a quelli degli altri trapianti, benché si possa notare una diversificazione, tra un trimestre e l'altro, delle fasce di isoconcentrazione.

Le figure 3.33 e 3.34 mostrano, rispettivamente, lo "scattergram" ottenuto dall'applicazione della DCA ed il risultato della *Cluster Analysis*.

L'applicazione di tali tecniche di analisi multivariata (DCA e *Cluster Analysis*) ha evidenziato 3 raggruppamenti.

Il coefficiente di determinazione ottenuto dall'analisi di correlazione tra le distanze di ordinazione e quelle nello spazio originale suggerisce con evidenza che la quasi il 91,2% della variazione totale è associata al primo asse. Dunque l'eventuale presenza di discontinuità tra la sequenza di stazioni presente nel diagramma va ricercata lungo tale asse. Ciò risulta in buona parte confermato anche dalla *Cluster Analysis*, caratterizzata da una percentuale di "chaining" del 3,46%.

Ai fini di validare statisticamente la presenza di tali raggruppamenti stagionali è stata nuovamente eseguita sul *dataset* originale una *Multi Response Permutational Procedure* (MRPP) per testare l'effetto della variazione del fattore "Gruppi" su quella dell'insieme dei parametri ecofisiologici presi in esame.

Il risultato è mostrato nella tabella 3.19.

| MRPP |
|---|
| Test statistic: T = -25.269520 |
| Observed delta = 0.85371378E-01 |
| Expected delta = 0.12736509 |
| Variance of delta = 0.27616870E-05 |
| Skewness of delta = -1.2057841 |
| Chance-corrected within-group agreement, A = 0.32971130 |
| A = 1 - (observed delta/expected delta) |
| Amax = 1 when all items are identical within groups (delta=0) |
| A = 0 when heterogeneity within groups equals expectation by chance |
| A < 0 with more heterogeneity within groups than expected by chance |
| Probability of a smaller or equal delta, p = 0.00000000 |

Tabella 3.19 – Risultato della MRPP eseguita sul dataset di parametri ecofisiologici relativi al quarto trapianto lichenico.

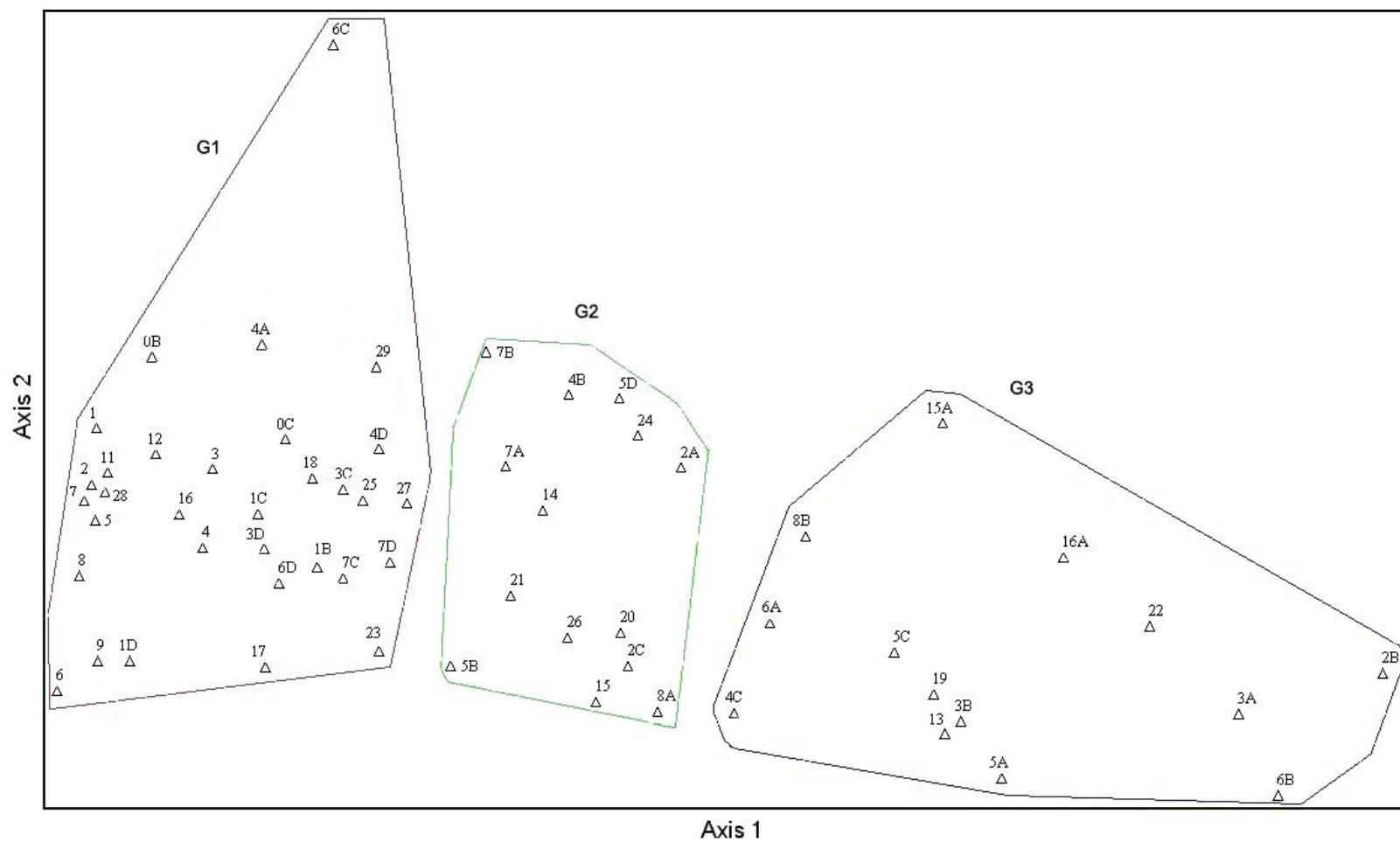


Figura 3.33 – Diagramma di ordinazione ottenuto eseguendo una DCA sul dataset di parametri ecofisiologici relativi al quarto trapianto lichenico nell'area di studio (febbraio 2011 - aprile 2011).

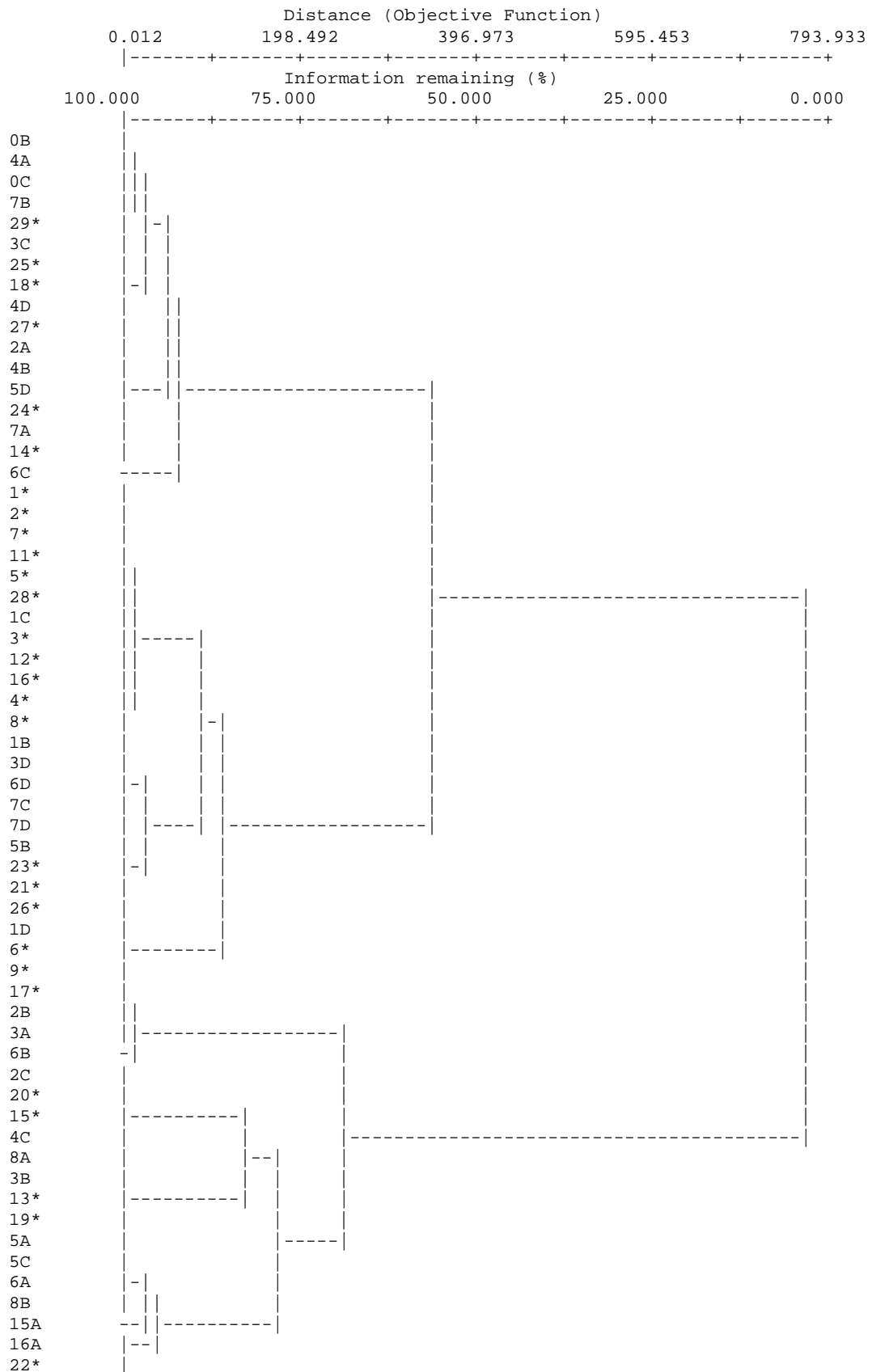


Figura 3.34 – Dendrogramma ottenuto dalla *Cluster Analysis* eseguita sul dataset di parametri ecofisiologici relativi al quarto trapianto lichenico nell’area di studio (febbraio 2011 - aprile 2011).

La successiva esecuzione di una ANOVA parametrica con relativo *test post hoc* per confronto multiplo di medie (Tab. 3.20), non ha rilevato alcun parametro in particolare a cui potere addebitare il risultato della MRPP.

| Parametri ecofisiologici | F | p | C.S.S. (p < 0,05) |
|---------------------------------|----------|----------|-----------------------------|
| EC% | 1,87 | 0,164 | ---- |
| TBA RS | 1,25 | 0,294 | ---- |
| A492 | (*) | | |
| Fv/Fm | 0,64 | 0,529 | ---- |
| Clo" a" | 0,52 | 0,595 | ---- |
| Clo" b" | 0,45 | 0,640 | ---- |
| Xan + β Car | 0,39 | 0,677 | ---- |
| A435/A415 | 0,28 | 0,755 | ---- |

Tabella 3.20 – Risultato dell'ANOVA ad 1 via eseguita sui parametri ecofisiologici tra i gruppi di stazioni individuati con l'analisi multivariata: (G = Gruppo), (*) ANOVA non eseguita in quanto i dati hanno mostrato un valore di $p < 0,05$ nel test di Eguaglianza delle Varianze, (C.S.S.= Confronti tra mediane Statisticamente Significativi).

Tuttavia l'osservazione dei punteggi attribuiti dalla DCA ai parametri rispetto all'asse 1 ha chiaramente rilevato che quello ampiamente più alto risulta assegnato alla respirazione, come pure l'osservazione del valore medio di ciascun parametro, in ognuno dei tre raggruppamenti, ha messo in evidenza la presenza di sensibili differenze solo nel caso della respirazione (Tabb. 3.21 e 3.22).

| Parametro | Punteggio |
|----------------------------------|------------------|
| A492 | 234 |
| Conducibilità elettrica | 48 |
| Xantofille + β Carotenoidi | 13 |
| Clorofilla "a" | 11 |
| Clorofilla "b" | 11 |
| Sostanze TBA reattive | 7 |
| A435/A415 | -12 |
| Fv/Fm | -24 |

Tabella 3.21 – Punteggi assegnati sull'asse 1 della DCA ai parametri ecofisiologici.

| | EC% | A492 | Fv/Fm | TBA RS | Clo"a" (µg/g p.s.) | Clo"b" (µg /g p.s.) | Xan + βcar (µg /g p.s.) | A435/A415 (µg/g p.s.) |
|-----------------|------------|-------|------------|------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Gruppo 1 | 14,88 | 0,85 | 0,68 | 14,49 | 1346,64 | 398,42 | 597,59 | 1,32 |
| | (CV=22,48) | 38,91 | (CV=7,93) | (CV=33,90) | (CV=23,81) | (CV=21,88) | (CV=19,54) | (CV=2,63) |
| Gruppo 2 | 14,36 | 1,36 | 0,66 | 12,36 | 1393,57 | 410,57 | 612,00 | 1,31 |
| | (CV=14,86) | 6,01 | (CV=13,28) | (CV=22,45) | (CV=24,74) | (CV=22,54) | (CV=20,44) | (CV=3,01) |
| Gruppo 3 | 16,95 | 1,67 | 0,65 | 15,10 | 1274,78 | 380,65 | 574,90 | 1,32 |
| | (CV=34,63) | 7,54 | (CV=17,47) | (CV=42,70) | CV=18,96) | (CV=17,54) | (CV=14,63) | (CV=2,46) |

Tabella 3.22 – Valore medio e coefficiente di variazione (CV) dei valori dei parametri relativi ai tre gruppi individuati dall'applicazione delle tecniche di analisi multivariata (DCA, *Cluster Analysis* ed MRPP).

Ciò consente, sia pure con una certa cautela, di ritenere che la respirazione sia un fattore di sensibile importanza nella determinazione dei tre gruppi stazionali individuati.

Andando successivamente a georeferenziare tali raggruppamenti, appare evidente un marcato livello di interdispersione delle stazioni afferenti a ciascuno di questi, sebbene si possa individuare una marcata prevalenza di stazioni del Gruppo 1 nella fascia di stazioni sita a sud e corrispondente alla zona con elevata densità agricola, ed una presenza prevalente delle stazioni afferenti ai Gruppi 2 e 3 al di sopra di tale zona, tanto nel versante occidentale quanto in quello orientale (rispetto alla cemenzeria).

Tale risultato appare in buon accordo con quello ottenuto dall'osservazione delle carte di isoconcentrazione dei parametri ecofisiologici e supporta l'ipotesi che in tale fascia siano presenti fattori di depressione della respirazione (azoto ammoniacale, altri inquinanti o possibile interazione tra questi) che sembrano attenuarsi allontanandosi da essa in direzione nord.

In fine si riporta il confronto tra i valori dei singoli parametri stazionali con quelli dell'area sorgente (Tab. 3.23), che sottolinea la condizione di sostanziale miglioramento a cui l'area di studio va incontro, come già evidenziato dal *trend* temporale dei valori di tendenza centrale (Figg. 3.23 – 3.25) e dalla variazione della dimensione delle fasce di isoconcentrazione passando dal terzo al quarto trapianto.

| QUARTO TRAPIANTO | | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|--------|----------|----------|-------------------|-----------|
| GRUPPI | E.C.% | A492 | Fv/Fm | TBA RS | Clo''a'' | Clo''b'' | Xan + β Car | A435/A415 |
| 1 | 16/32 | 14/32 | 14/32 | 31/32 | 16/32 | 18/32 | 21/32 | 32/32 |
| 2 | 5/14 | 14/14 | 6/14 | 14/14 | 8/14 | 9/14 | 10/14 | 14/14 |
| 3 | 8/14 | 14/14 | 6/14 | 14/14 | 6/14 | 6/14 | 7/14 | 14/32 |

Tabella 3.23 – Quota di stazioni che mostrano un valore superiore a quello del sito di riferimento per ciascun parametro ecofisiologico relativa al quarto trapianto lichenico.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

La presente attività di ricerca finalizzata all'utilizzo del lichene *Pseudevernia furfuracea* per il monitoraggio della qualità dell'aria nel distretto territoriale sito tra i comuni di Castrovillari, Eianina e Frascineto (Cs), comprendente un impianto per la manifattura del cemento, le cave di produzione del materiale greggio, un'area industriale ad ovest della cementeria di modeste dimensioni svolgente prevalentemente attività di servizio, una serie di discariche abusive tra cui, segnatamente, alcuni depositi piuttosto grandi di pneumatici dismessi, una fascia di bosco recante segni di marcata alterazione a causa di un incendio pregresso, un'area sottoposta ad intenso sfruttamento agricolo (viticoltura, olivicoltura e cerealicoltura), ha permesso il conseguimento dei sottoindicati risultati:

- 1) l'idoneità del lichene *Pseudevernia furfuracea* a monitorare eventi di contaminazione ambientale associati all'immissione in atmosfera di metalli pesanti, come risulta tanto dal verificarsi quanto dal non verificarsi di processi di bioaccumulo di elementi in traccia in presenza di condizioni climatiche favorevoli alle richieste ecologiche di tale specie (terzo e quarto trapianto);
- 2) il manifestarsi di condizioni di stress fisiologico quando fondamentali parametri meteo - climatici quali la temperatura e l'umidità tendono a discostarsi sensibilmente dai relativi *optima* biologici. Tale discostamento potrebbe avere influito sulla capacità di *Pseudevernia furfuracea* di accumulare metalli nella sua biomassa, come suggeriscono recenti indicazioni della letteratura scientifica. Tuttavia non è chiaro se a tale risultato possa avere concorso anche la mancata o ridotta immissione in atmosfera di tali contaminanti. Difatti, se da un lato le indicazioni derivanti dai dati relativi al monitoraggio dell'autostrada supportano questa ipotesi, altrettanto non si può dire circa le altre sorgenti di metalli presenti in zona, a partire dalla cementeria;
- 3) l'efficacia della batteria di test ecofisiologici prescelti nel tracciare, rispetto al tempo ed allo spazio, la presenza di fattori di stress ambientale che si risolvono in differenti livelli di alterazione cellulare;
- 4) il differente contributo temporale alla compromissione della qualità dell'aria, come pure la verisimile differente sorgente antropica primaria di alcuni inquinanti gassosi e, segnatamente, gli ossidi di azoto e l'ammoniaca. I primi sono chiaramente riconducibili alla circolazione veicolare che si determina lungo l'autostrada A3, in quanto sviluppano i più elevati valori di concentrazione media giornaliera, solo nei siti di monitoraggio collocati nelle vicinanze della

carreggiata nei mesi di luglio ed agosto 2010, in corrispondenza dei più alti flussi di autovetture dovuti ai picchi di attività turistiche. Tali valori, in base alla normativa vigente, possono costituire elemento di preoccupazione per la salute umana, ma non per l'integrità dei talli di *Pseudevernia furfuracea*. Nel caso dell'ammoniaca, sono stati rilevati valori di concentrazione media giornaliera ininfluenti per la protezione dell'uomo ma, su base stagionale, probabilmente critici per lo status fisiologico di *Pseudevernia furfuracea*. Difatti, se nel periodo primaverile - estivo le concentrazioni misurate possono ricondursi ad una situazione di eutrofizzazione per un lichene acidofilo quale quello prescelto in tale studio, i valori misurati nella fase autunno - vernina (in corrispondenza della quale è noto che le tipologie di colture presenti richiedono un incremento del tasso di fertilizzazione azotata) configurano una condizione di stress alla quale potrebbe associarsi una depressione dei livelli di respirazione (accompagnata, tuttavia, prevalentemente da un incremento dei livelli di pigmenti) nei talli di un certo numero di stazioni collocate nella fascia ad intenso sfruttamento agricolo, sita nel versante meridionale dell'area di studio;

- 5) il differente contributo temporale alla compromissione della qualità dell'aria, come pure la verisimile differente sorgente antropica primaria di alcuni metalli pesanti e, segnatamente, il calcio, il ferro, il magnesio, il vanadio, il manganese, il sodio, l'alluminio ed il rame. Nel trimestre novembre 2010 - febbraio 2011, i talli esposti nell'area di studio manifestano fenomeni di bioaccumulo di dimensioni sensibili o molto sensibili (in termini di superamento della soglia di bioaccumulo e di numero di siti che sviluppano tale processo) a carico di tutti i metalli esaminati, ma solo quelli summenzionati sviluppano concentrazioni che la letteratura indica come frequentemente associati a contesti territoriali caratterizzati da elevati livelli di industrializzazione/urbanizzazione. I picchi di concentrazione estremamente elevati di calcio e ferro (noti marcatori delle deposizioni alcaline associate all'attività di cementifici), la somiglianza del loro rapporto e del rapporto tra gli altri metalli e calcio e ferro nelle emissioni di cementifici che utilizzano tipi di combustibile paragonabile a quello adoperato nell'impianto dell'Italcementi e nei talli esposti di *Pseudevernia furfuracea* e la correlazione (statisticamente significativa) tra distanza dalla cemeniera e le concentrazioni di arsenico, cadmio, antimonio e molibdeno, sono tutti elementi che suggeriscono, con una certa evidenza, che l'impianto per la manifattura del cemento abbia sensibilmente contribuito al significativo processo di inquinamento atmosferico da metalli pesanti. Ovviamente non è possibile escludere che anche altre sorgenti possano avere concorso a tale risultato, ma

ne resta da individuare la natura ed il contributo. Per quanto riguarda l'autostrada non è possibile valutare con esattezza il relativo contributo dell'emissione in atmosfera di metalli pesanti visto, nel caso del primo trapianto, lo stress fisiologico dei talli esposti e, nel terzo trapianto, il sovrapporsi ad un eventuale contributo dell'autostrada di un evento di contaminazione intenso e diffuso a tutta l'area di studio. In condizioni meteorologiche favorevoli, si ha, nel quarto trapianto, uno scarso accumulo di metalli, dovuto alla diminuzione dell'intensità del traffico veicolare, come confermato dai bassi livelli di NO_x monitorati in tale periodo;

- 6) va sottolineato che tanto l'applicazione della scala Nimis & Bargagli (1999) quanto quella elaborata nel corso di tale tesi di dottorato (S.R.F.), hanno mostrato lo sviluppo di sensibili livelli di alterazione ambientale in corrispondenza del trimestre novembre 2010 - gennaio 2011. Ciò rappresenta un risultato che conferma la bontà della scala messa a punto, anche se il numero limitato di fonti a cui si è attinto rappresenta il suo momentaneo limite principale;
- 7) le analisi di correlazione tra le concentrazioni dei metalli ed i parametri ecofisiologici si caratterizzano per valori di "r" statisticamente significativi, di dimensioni modeste o moderate, un risultato che è a supporto dell'idea che anche altri contaminanti abbiano concorso all'evoluzione spaziale e temporale dell'alterazione dei parametri ecofisiologici. In particolare, è emerso che il danno cellulare manifestato dai talli potrebbe risultare tanto da meccanismi di stress ossidativo quanto da altri processi quali, sottrazione della radiazione, depauperamento dei nutrienti essenziali e plasmolisi, questi ultimi tutti sintomi riconducibili agli effetti delle deposizioni alcaline;
- 8) la comparazione dei valori dei parametri ecofisiologici misurati nei talli esposti con quelli misurati nei talli dell'area sorgente, insieme alla georeferenziazione dei livelli di danno cellulare, ottenuta attraverso la realizzazione di carte di isoconcentrazione e l'applicazione di tecniche di analisi multivariata ed univariata, per dare un sostegno in termini di significatività statistica ai *trend* rilevati, hanno messo in evidenza: a) la presenza di un'area a costante criticità (rilevata in tutti i trimestri), in termini di status ecofisiologico dei licheni, sita ad ovest della cemeniteria; b) lo sviluppo di una compromissione ambientale relativa all'intera area di studio, quando le condizioni climatiche risultano favorevoli al lichene, ma appare palese un fenomeno di contaminazione da metalli (trimestre novembre 2010 - gennaio 2011), a cui si associa una zona di ulteriore criticità di dimensioni più ristrette e comprendente la cemeniteria, l'area

industriale di Castrovillari, un tratto dell'autostrada ed un'area interessata dalla presenza di discariche abusive. Vista l'eterogeneità delle fonti di contaminanti ivi presenti è plausibile che altri tipi di inquinanti, oltre ai metalli pesanti, abbiano contribuito all'alterazione dei parametri ecofisiologici misurati.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adamec L. (1984).** The effect of plasmolysis and deplasmolysis on the permeability of plant membranes. *Biologia Plantarum*, **26**(2): 128-131.
- Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobiانchi R. and Violante P. (2003).** Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution*, **122**(1): 91-103.
- Adamson E. & Seppelt R.D. (1990).** A comparison of airborne alkaline pollution damage in selected lichens and mosses at Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. In: Kerry K.R., Hempel G. (eds.), *Antarctic Ecosystems, Ecological Change and Conservation*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 347.
- ANPA (2001).** I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. Manuali e Linee Guida 2/2001. ANPA, Dipartimento Stato dell'Ambiente, Controlli e Sistemi Informativi, Roma.
- Asta J., Erhardt W., Ferretti M., Fornasier F., Kirschbaum U., Nimis P.L., Purwis O.W., Pirintsos S.A., Scheidegger C., van Haluwyn C. and Wirth V. (2002).** Mapping lichen diversity as an indicator of environmental quality. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), *Monitoring with lichens – Monitoring lichens*. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, vol. 7. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 273-279.
- Ayrault S., Clochiatti R., Carrot F., Daudin L. and Bennett J.P. (2007).** Factors to consider for trace element deposition biomonitoring surveys with lichen transplants. *Science of the Total Environment*, **372**(2-3): 717-727.
- Bačkor M. & Fahselt D. (2005).** Tetrazolium reduction as an indicator of environmental stress in lichens and isolated bionts. *Environmental and Experimental Botany*, **53**(2): 125-133.
- Bačkor M. & Loppi S. (2009).** Interactions of lichens with heavy metals. *Biologia Plantarum*, **53**(2): 214-222.
- Bačkor M., Fahselt D., Davidson R. and Wu C.T. (2003).** Effects of copper on wild and tolerant strains of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **45**(2): 159-167.
- Baptista M.S., Vaconcelos M.T.S.D., Cabral J.P., Freitas M.C. and Pacheco A.M.G. (2008).** Copper, nickel and lead in lichen and tree bark transplants over different periods of time. *Environmental Pollution*, **151**(2): 408-413.

- Bargagli R. (1995).** 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*: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 65-84.
- Bargagli R., Iosco F.P. and D’Amato M.L. (1987).** Zonation of trace metal accumulation in three species belonging to the genus *Parmelia*. *Cryptogamie Bryologie et Lichénologie*, **8**(4): 331-337.
- Bargagli R., Cruscanti M., Leonzio C. and Bacci E. (1998).** I bioindicatori. *In*: Vighi M., Bacci E. (eds.), *Ecotossicologia*. UTET, Torino: 46-59.
- Bari A., Rosso A., Minciardi M.R., Troiani F. and Piervittori R. (2001).** Analysis of heavy metal in atmospheric particulates in relation to their bioaccumulation in explanted *Pseudevernia furfuracea* thalli. *Environmental Monitoring and Assessment*, **69**: 205-220.
- Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S. and Davison A.W. (1992).** A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **32**(2): 85-100.
- Basile A., Sorbo S., Aprile G., Conte B. and Cobianchi R.C. (2008).** Comparison of the heavy metal accumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. *Environmental Pollution*, **151**(2): 401-407.
- Bates J.W. & Farmer A.M.(1990).** An Experimental Study on Calcium Acquisition and its Effects on the Calcifuge Moss *Pleurozium schreberi*. *Annals of botany*, **65**(1): 87-96.
- Beckett R.P., Kranner I. and Minibayeva F.V. (2002).** Stress physiology and the symbiosis. *In*: Nash III T.H (ed.) *Lichen Biology*. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge: 134-151.
- Belnap J. & Harper K.T. (1990).** Effects of a Coal-Fired Power Plant on the Rock Lichen *Rhizoplaca melanophthalma*: Chlorophyll Degradation and Electrolyte Leakage. *The Bryologist*, **93**(3): 309-312.
- Bergamaschi L., Rizzio E., Giaveri G., Loppi S. and Gallorini M. (2007).** Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. *Environmental Pollution*, **148**(2): 468-476.

- Bialońska D. & Dayan F.E. (2005).** Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *Journal of Chemical Ecology*, **31**(12): 2975-2991.
- Boonpragob K. & Nash III T.H. (1990).** Seasonal variation of elemental status in the lichen *Ramalina menziesii* Tayl. from 2 sites in southern California: evidence for dry deposition accumulation. *Environmental and Experimental Botany*, **30**(4): 415-428.
- Branquinho C. & Brown D.H. (1994).** A method for studying the cellular location of lead in lichens. *The Lichenologist*, **26**: 83-90.
- Branquinho C., Brown D.H., Máguas C. and Catarino F. (1997).** Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environmental and Experimental Botany*, **37**(2-3): 95-105.
- Branquinho C., Gaio-Oliveira G., Augusto S., Pinho P., Máguas C. and Correia O. (2008).** Biomonitoring spatial and temporal impact of atmospheric dust from a cement industry. *Environmental Pollution*, **151**(2): 292-299.
- Branscome M. (1984).** Evaluation of Waste Combustion in a Dry-Process Cement Kiln at Lone Star Industries, Oglesby, OH. EPA-69-02-3149.
- Britto D.T. & Krtozuncher H.J. (2002).** NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, **159**: 567-584.
- Brown D.H. & Hooker T.N. (1977).** The significance of acidic lichen substances in the estimation of chlorophyll and phaeophytin in lichens. *New Phytologist*, **78**: 617-624.
- Brown D.H. & Brown R.M. (1991).** Mineral cycling and lichens: the physiological basis. *The Lichenologist*, **23**(3): 293-307.
- Calatayud A., Deltoro V.I., Barreno E. and del Valle-Tascon S. (1997).** Changes in vivo chlorophyll fluorescence quenching in lichen thalli as a function of water content and suggestion of zeaxanthin-associated photoprotection. *Physiologia Plantarum*, **101**(1): 93-102.
- Camejo D., Jiménez A., Alarcón J.J., Torres W., Gómez J.M. and Sevilla F. (2006).** Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. *Functional Plant Biology*, **33**(2): 177-187.
- Campo G., Orsi M., Badino G., Giacomelli R. and Spezzano P. (1996).** Evaluation of motorway pollution in a mountain ecosystem. Pilot project: Susa Valley (Northwest Italy) years 1990-1994. *Science of the Total Environment*, **189/190**: 161-166.

- Cape J.N., van der Eerden L.J., Sheppard L.J., Leith I.D. and Sutton M.A. (2009).** Evidence for changing the Critical Level for ammonia. *Environmental Pollution*, **157**(3): 1033-1037.
- Carreras H.A. & Pignata M.L. (2002).** Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution*, **117**(1): 77-87.
- Carreras H.A. & Pignata M.L. (2007).** Effects of heavy metals Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on some physiological parameters of the lichen *Usnea amblyoclada*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **67**(1): 59-66.
- Carreras H.A., Wannaz E.D., Perez C.A. and Pignata M.L. (2005).** The role of urban air pollutants on the performance of heavy metal accumulation in *Usnea amblyoclada*. *Environmental Research*, **97**(1): 50-57.
- Carreras H.A., Wannaz E.D. and Pignata M.L. (2009).** Assessment of human health risk related to metals by the use of biomonitors in the province of Córdoba, Argentina. *Environmental Pollution*, **157**(1): 117-122.
- Castello M., Nimis P.L., Alleleo D. and Bellio M.G. (1994).** Biomonitoring of SO₂ and metal pollution with lichens and barks in Savona (N Italy). *Bollettino della Società Adriatica*, **75**(1): 61-83.
- Cepeda Fuentes J.M. & Garcia Rove J. (1998).** The effect of air pollution from nitrogen dioxide (NO₂) on epiphytic lichens in Seville, Spain. *Aerobiologia*, **14**: 241-247.
- Cercasov V., Pantelică A., Sălăgean M., Caniglia G. and Scarlat A. (2002).** Comparative study of the suitability of three lichen species to trace-element air monitoring. *Environmental Pollution*, **119**(1): 129-139.
- Chisholm J.E., Jones G.C. and Purvis O.W. (1987).** Hydrated copper oxalate, moolooite, in lichens. *Mineralogical Magazine*, **51**: 715-718.
- Cislaghi C. & Nimis P.L. (1997).** Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature*, **387**(6632): 463-464.
- Conesa J.A., Gálvez A., Mateos F., Martín-Gullón I. and Font R. (2008).** Organic and inorganic pollutants from cement kiln stack feeding alternative fuels. *Journal of Hazardous Materials*, **158**(2-3): 585-592.
- Conti M.E. & Cecchetti G. (2001).** Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution*, **114**(3): 471-492.
- Conti M.E., Tudino M., Stripeikis J. and 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.

- Conway E.D. & Maryland Space Grant Consortium (1997).** An introduction to satellite image interpretation. John Hopkins University Press, Maryland, pp. 242.
- Cristofolini F., Giordani P., Gottardini E. and Modenesi P. (2008).** The response of epiphytic lichens to air pollution and subsets of ecological predictors: a case study from the Italian Prealps. *Environmental Pollution*, **151**(2): 308-317.
- Cruz C., Bio A.F.M., Dominguez-Valdivia M.D., Aparicio-Tejo P.M., Lamsfus C. and Martins-Louçao M.A. (2006).** How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta*, **223**(5): 1068-1080.
- Culberson C.F. & Kristinsson H. (1970).** A standardized method for the identification of lichen products. *Journal of Chromatography*, **46**(1): 85-93.
- Czaja A.T. (1966).** Über die Einwirkung von Stauben, speziell von Zementofenstaub auf Pflanzen. *Angewandte Botanik*, **40**: 106-120.
- D.Lgs. n° 171 del 21 maggio 2004.** Attuazione della direttiva 2001/81/CE relativa ai limiti nazionali di emissione di alcuni inquinanti atmosferici. Pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n° 165 del 16 luglio 2004.
- D.M. n° 60 del 2 aprile 2002.** Recepimento della direttiva 1999/30/CE del Consiglio del 22 aprile 1999 concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo e della direttiva 2000/69/CE relativa ai valori limite di qualità dell'aria ambiente per il benzene ed il monossido di carbonio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n° 87, del 13 aprile 2002.
- D.P.R. n° 203 del 24 maggio 1988.** Attuazione delle direttive CEE numeri 80/779, 82/884, 84/360 e 85/203 concernenti norme in materia di qualità dell'aria, relativamente a specifici agenti inquinanti, e di inquinamento prodotto dagli impianti industriali, ai sensi dell'art.15 della legge 16 aprile 1987, n° 183. Pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n° 140 del 16 giugno 1988.
- Davey M.W., Stals E., Panis B., Keulemans J. and Swennen R.L. (2005).** High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **347**(2): 201-207.
- Davies L., Bates J.W., Bell J.N., James P.W. and Purvis O.W. (2007).** Diversity and sensitivity of epiphytes to oxides of nitrogen in London. *Environmental Pollution*, **146**(2): 299-310.
- Di Lella L.A. (2010).** Biomonitoraggio della Contaminazione atmosferica da Traffico veicolare nella città di Siena. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Applicate all'Ambiente, Università degli studi di Siena, a.a. 2009-2010.

- Di Lella L.A., Gaggi C., Loppi S., Nicolardi V., Pisani T., Protano G. and Riccobono F. (2005).** Analisi del rischio ecotossicologico da traffico veicolare: un'applicazione a piccola scala. XV Congresso SItE "Ambiente, Risorse e Sviluppo", Torino: 81-82.
- Direttiva 1999/30/CE.** Direttiva del Consiglio concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo. (G.U.U.E. 29 giugno 1999 n° L 163) - Testo coordinato con la Decisione della Commissione n° 744 del 17 ottobre 2001.
- Dzubai A., Bačkor M., Tomko J., Peli E. and Tuba Z. (2008).** Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L) Th. Fr. to metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70**: 319-326.
- Edwards L.O., Muela C.A., Sawyer R.E., Thompson C.M. and Williams D.H. (1980).** Trace Metals and Stationary Conventional Combustion Processes. U.S. Government Printing Office: Washington DC., Vol. 1, Section 5, pp. 22-52. EPA-600/7-80-155A.
- Escudero A., Iriondo J.M. and Elena Torres M. (2003).** Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, **113**: 351-365.
- Fagian M.M., Pereira-da-Silva L., Martins I.S. and Vercesi A.E. (1990).** Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxydants. *Journal of Biological Chemistry*, **265**(32): 19955-19960.
- Fahselt D. (1994).** Secondary biochemistry in lichens. *Symbiosis*, **16**: 117-165.
- Farmer A.M. (1993).** The effects of dust on vegetation – a review. *Environmental Pollution*, **79**: 63-75.
- Farrar J.F. (1976).** The uptake and metabolism of phosphate by the lichen *Hypogymnia physodes*. *New Phytologist*, **77**: 127-134.
- Fernandez M.A., Martinez L., Segarra M., Garcia C.G. and Espiell F. (1992).** Behaviour of Heavy Metals in the Combustion Gases of Urban Waste Incinerators. *Environmental Science and Technology*, **26**(5): 1040-1047.
- Ferry B.W., Baddeley M.S. and Hawksworth D.L. (1973).** Air pollution and Lichens. University of Toronto Press, Toronto, pp. 390.
- Fiscus D.E., Gorman P.G., Schrag M.P. and Shannon L.J. (1977).** St. Louis demonstration final report: refuse processing plant equipment, facilities, and environmental evaluations. EPA-600/2-77- 155A.
- Fiscus D.E., Joensen A.W., Chantland A.O. and Olexsey R.A. (1980).** Evaluation of the performance of the disc screens installed at the city of Ames, Iowa resource

- recovery facility. Proceeding ASME National Solid Waste Processing Conference, May 11-14 Washington, DC: 485-496.
- Fletcher A. (1973).** The Ecology of Marine (Littoral) Lichens on some Rocky shores of Anglesey. *The Lichenologist*, **5**: 368-400.
- Fletcher A. (1976).** Nutritional aspects of marine and maritime lichen ecology. In: D.H. Brown, D.L. Hawksworth, R.H. Bailey (eds.), *Lichenology: Progress and Problems*, Academic Press, London: 359-384.
- Flora S.J.S., Bhaduria S., Kannan G.M. and Singh N. (2006).** Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: A review. *Journal of Environmental Biology*, **28**(2): 333-347.
- Frati L., Brunialtri G. and Loppi S. (2005).** Problems related to lichens transplants to monitor trace element deposition in repeated surveys: a case study from central Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **52**(3): 221-230.
- Frati L., Caprasecca E., Santoni S., Gaggi C., Guttova A. and Gaudino S. (2006).** Effects of NO₂ and NH₃ from road traffic on epiphytic lichens. *Environmental Pollution*, **142**(1): 58-64.
- Frati L., Brunialti G., Gaudino S., Pati A., Rosamilia S. and Loppi S. (2010).** Accumulation of nitrogen and changes in assimilation pigments of lichens transplanted in an agricultural area. *Environmental Monitoring and Assessment*, **178**(1-4): 19-24.
- Freitas M.C., Reis M.A., Marques A.P. and Wolterbeek H.Th. (2000).** Dispersion of chemical elements in an industrial environment studied by biomonitoring using *Parmelia sulcata*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **224**(1): 109-113.
- Freitas M.C., Reis M.A., Marques A.P. and Wolterbeek H.Th. (2001).** Use of lichen transplants in atmospheric deposition studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **249**(2): 307-315.
- Gaio-Oliveira G., Branquinho C., Maguas C. and Martin-Loucao M.A. (2001).** The concentration of nitrogen in nitrophilous and non-nitrophilous lichen species. *Symbiosis*, **31**: 187-199.
- Garty J. (2000).** Environment and elemental content of lichens. In: Markert B., Friese K. (eds.), *Trace element: Their distribution and effects in the environment*. Elsevier, Amsterdam: 245-276.
- Garty J. (2001).** Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **20**(4): 309-371.
- Garty J., Kardish N., Hagemeyer J. and Ronen R. (1988).** Correlations between the concentration of adenosine tri-phosphate, chlorophyll degradation and the

- amounts of airborne heavy metals and sulphur in a transplanted lichen. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **17**(5): 601-611.
- Garty J., Karary Y. and Harel J. (1992).** Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not) Bagl. *Environmental and Experimental Botany*, **32**: 229-241.
- Garty J., Kauppi M. and Kauppi A. (1996).** Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites. *Journal of Environmental Quality*, **25**(2): 265-272.
- Garty J., Kloog N., Cohen Y., Wolfson R. and Karnieli A. (1997).** The effect of air pollution on the integrity of chlorophyll, spectral reflectance response, and on concentrations of nickel, vanadium, and sulfur in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl.. *Environmental Research*, **74**(2): 174-187.
- Garty J., Weissman L., Tamir O., Beer S., Cohen Y., Karnieli Y. and Orlovsky L. (2000).** Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum*, **109**(4): 410-418.
- Garty J., Tamir O., Hassid I., Eshel A., Cohen Y., Karnieli A. and Orlovsky L. (2001).** Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance in lichens exposed to air pollution. *Journal of Environmental Quality*, **30**: 884-893.
- Garty J., Tomer S., Levin T. and Lehr H. (2003).** Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. *Environmental Research*, **91**(3): 186-198.
- Gasparo D., Castello M. and Bargagli R. (1989).** Biomonitoraggio dell'inquinamento tramite licheni. Studio presso un inceneritore (Macerata). *Studia Geobotanica*, **9**: 153-233.
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (G.U.U.E.) L. 152/30, 11 giugno 2008.** Allegato XI. Valori limite per la protezione della salute umana. Allegato XIII Livelli critici per la protezione della vegetazione.
- Gietl J.K., Lawrence R., Thorpe A.J. and Harrison R.M. (2010).** Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment*, **44**: 141-146.
- Gilbert O.L. (1976).** An Alkaline Dust Effect on Epiphytic Lichens. *The Lichenologist*, **8**: 173-178.
- Goc A. (2006).** Biological activity of vanadium compounds. *Central European Journal of Biology*, **1**(3): 314-332.
- Godinho R.M., Freitas M.C. and Wolterbeek H.Th. (2004).** Assessment of lichen vitality during a transplantation experiment to a polluted site. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **49**(1-3): 355-361.

- Godinho R.M., Wolterbeek H.Th., Verburg T. and 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**(2): 318-325.
- Godinho R.M., Verburg T.G., Freitas M.C and Wolterbeek H.Th. (2009).** Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of two species of epiphytic lichens transplanted to a polluted site in Portugal. *Environmental Pollution*, **157**(1): 102-109.
- Gomez S.R., Parker R.A., Dosman J.A. and MvDuffe H.H. (1992).** Respiratory health effect of alkali dust in residents near desiccated Old Wives Lake. *Archives of Environmental Health*, **7**(5),364-369.
- González C.M & Pignata M.L. (1994).** The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulphur and heavy metals in a transplanted lichen. *Chemistry and Ecology*, **9**(2): 105-113.
- González C.M & Pignata M.L. (1997a).** Chemical response of lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog transplanted close to a power station in an urban-industrial environment. *Environmental Pollution*, **97**(3): 195-203.
- González C.M. & Pignata M.L. (1997b).** Effect of pollutants emitted by different urban-industrial sources on the chemical response of the transplanted *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. & Flot. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **69**: 61-73.
- Grindon L.H. (1859).** The Manchester flora: a descriptive list of the plants growing wild within eighteen miles of Manchester, with notices of the plants commonly cultivated in gardens; preceded by an introduction to botany. London, W. White, pp. 575.
- Guidotti M., Stella D., Dominici C., Blasi G., Owczarek M., Vitali M. and Protano C. (2009).** Monitoring of traffic-related pollution in a province of central Italy with transplanted lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **83**(6): 852-858.
- Hale M.E. (1983).** The Biology of Lichens. Arnold E. (ed.), Third Edition. London, pp.190.
- Hall J.L., Joensen A.W., van Meter D., Wehage R., Severns G. and Reece R. (1979).** Evaluation of the Ames Solid Waste Recovery System. Part III. Environmental Emissions of the Stoker Fired Steam Generators. EPA-600/7-79-222.
- Halliwell B & Gutteridge J.M.C. (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition. Clarendon Press, Oxford, pp. 346.

- Hart R., Webb P.G., Biggs R.H. and Portier K.M. (1988).** The use of lichen fumigation studies to evaluate the effects of new emission sources on class I areas. *Journal of Air Pollution Control Association*, **38**(2): 144-147.
- Hauck M. (2010).** Ammonium and nitrate tolerance in lichens. *Environmental Pollution*, **158**(5): 1127-1133.
- Hawksworth D.L. & Rose F. (1970).** Quality scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, **37**(1): 77-91.
- Hill M.O. & Gauch H.G. (1980).** *Detrended Correspondance Analysis*: an improved ordination technique. *Vegetatio*, **42**: 47-58.
- Huang Z.A., Jiang D.A., Yang Y., Sun J.W. and Jin S.H. (2004).** Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica*, **42**(3): 357-364.
- Jager H.J. & Weigel H.J.(1978).** Amino acid metabolism in Lichens. *The Bryologist*, **81**(1): 107-113.
- Jóźwiak M. (2009).** Influence of cement industry on accumulation of heavy metals in bioindicators. *Ecological Chemistry and Engineering*, **16**(3): 323-334.
- Karim M.D.A., Fracheboud Y. and Stamp P. (1999).** Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. *Physiologia Plantarum*, **105**(4): 685-693.
- Knops J.M.H., Nash III T.H., Boucher V.L. and Schlesinger W.L. (1991).** Mineral cycling and epiphytic lichens: implications at the ecosystem level. *The Lichenologist*, **23**(3): 309-321.
- Koolman J. & Roehm R.K. (2005).** Color Atlas of Biochemistry. Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 467.
- Kortesharju J., Savonen K. and Saynatkari T. (1990).** Element contents of raw humus, forest moss and reindeer lichens around a cement works in northern Finland. *Annales Botanici Fennici*, **27**(3): 221-230.
- Kricke R. & Loppi S. (2002).** Bioindication: the I.A.P. approach. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 21-37.
- Kwon T.M., Menzel D.B. and Olcott J. (1965).** Reactivity of malondialdehyde with food constituent. *Journal of Food Science*, **30**: 808-813.
- Lai J.C.K. & Cooper A.J.L. (1991).** Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochemical Research*, **16**(7): 795-803.

- Lambers H. (1985).** Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. *In:* Douce R, Day DA (eds.), *Encyclopedia of plant physiology*, New series, Vol. 18. Higher plant cell respiration. Springer-Verlag, New York: 418-473.
- Lawrey J.D. & Rudolph E.D. (1975).** Lichen accumulation of some heavy metals from acidic surface substrates of coal mine ecosystems in South-Eastern Ohio. *Ohio Journal of Science*, **75**: 113-117.
- Lazaridis M. (2010).** First principles of meteorology and air pollution. *Springer*, London, pp. 362.
- Lemaistre V. (1985).** Influence of automobile exhaust and lead on the oxygen exchange of two lichens measured by a new oxygen electrode method. *In:* Brown D.H. (ed.), *Lichen physiology and cell biology*, Plenum Press, New York: 173-183.
- Lena C. & Pirollo L. (2010).** Qualità dell'Aria e Politiche Ambientali nella Provincia di Frosinone. Strategie e Metodi di Intervento. Angeli F. (ed.), Milano, pp. 204.
- LeSueur P. & Puckett K.J. (1980).** Effect of vanadium on the phosphatase activity of lichens. *Canadian Journal of Botany*, **58**(4): 502-504.
- Loppi S. (1996).** Lichens as bioindicators of geothermal air pollution in central Italy. *The Bryologist*, **99**(1): 41-48.
- Loppi S. (2006).** Licheni come bioaccumulatori di elementi in traccia: stato della ricerca in Italia. *Biologia Ambientale*, **20**(2): 69-78.
- Loppi S. & Pirintos S.A. (2000).** Effect of dust on epiphytic lichen vegetation in the Mediterranean area (Italy and Greece). *Israel Journal of Plant Sciences*, **48**(2): 91-95.
- Loppi S. & Pirintos S.A. (2003).** Epiphytic lichens as sentinels for heavy metal pollution at forest ecosystems (central Italy). *Environmental Pollution*, **121**(3): 327-332.
- Loppi S., Pirintos S.A. and De Dominicis V. (1999).** Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, Central Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, **58**: 121-131.
- Loppi S., Putortì E., Pirintos S. A. and De dominicis V. (2000).** Accumulation of heavymetals in epiphytic lichens near a municipal solidwaste incinerator (central Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, **61**: 361-371.
- Loppi S., Paoli L. and Gaggi C. (2006).** Diversity of epiphytic lichens and Hg contents of *Xanthoria parietina* thalli as monitors of geothermal air pollution in the Mt. Amiata area (central Italy). *Journal of Atmospheric Chemistry*, **53**(2): 93-105.

- Lorenzini G. & Nali C. (2005).** Le Piante e l'Inquinamento dell'Aria. Terza Edizione. Springer-Verlag, Milano, pp. 247.
- Lounamaa K.J. (1965).** Studies on the content of iron, manganese and zinc in macrolichens. *Annales Botanici Fennici*, **2**: 127-137.
- Manning W.J. & Feder W.A. (1980).** Biomonitoring Air Pollutants with Plants. Applied Science Publishers, London, pp. 141.
- Manoli E., Voutsas D. and Samara C. (2002).** Chemical characterization and source identification/apportionment of fine and coarse air particles in Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, **36**(6): 949-961.
- Marconi A. (1996).** Polveri, fumi e nebbie aerodispersi: criteri e sistemi di campionamento. In: Lazzaretti G., Govoni C. (eds.), *Il rischio chimico negli ambienti di lavoro*. Modena 10-12 ottobre 1996, Regione Emilia Romagna, Azienda USL di Modena: 271-278.
- Marconi A. (2003).** Materiale particolato aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **39**(3): 329-342.
- Markert B., Oehlmann J. and Roth M. (1997).** General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. In: Subramanian K.S., Iyengar G.V. (eds.), *Environmental Biomonitoring – Exposure Assessment and Specimen Banking*, Chapter II, pp. 19-29. ACS Symposium Series Vol. 654, American Chemical Society, Washington, DC.
- Marmor L. & Randlane T. (2007).** Effects of road traffic on bark pH and epiphytic lichens in Tallinn. *Folia Cryptogamica Estonica*, **43**: 23-27.
- Marques A.P., Freitas M.C., Wolterbeek H.T., Steinebach O.M., Verburg T. and De Goeij J.M. (2005).** Cell-membrane damage and element leaching in transplanted *Parmelia sulcata* lichen related to ambient SO₂, temperature, and precipitation. *Environmental Science & Technology*, **39**: 2624-2630.
- Matsumoto H., Wachiuchi N. and Takashi E. (2006).** Changes of some mitochondrial enzyme activities of cucumber leaves during ammonium toxicity, *Physiologia Plantarum*, **25**(3): 353-357.
- McCune B. & Grace J.B. (2002).** Analysis of Ecological Communities. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, pp.300.
- McDonald G.K. & Paulsen G.M. (1997).** High temperature effects on photosynthesis and water relations of grain legumes. *Plant and Soil*, **196**(1): 47-58.
- Mejare M. & Bulow L. (2001).** Metal binding protein and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, **19**(2): 67-73.

- Miani N., Morgan B., Grahonja R. and Fragiacomò L. (2003).** Monitoraggio dell'inquinamento della Provincia di Trieste tramite la biodiversità dei licheni epifiti. *Biologi Italiani*, anno XXXIII n° 1: 56-60.
- Miani N., Skert N., Grahonja R. and Mariuz M. (2006).** Atlante dei licheni epifiti più comuni rinvenuti in studi di biomonitoraggio ambientale nella provincia di Trieste. ARPA FVG, Dipartimento di Trieste: 1-9.
- Mikhailova I. (2002).** Transplanted lichens for bioaccumulation studies. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol. 7. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands: 301-304.
- Modenesi P. (2003).** Meccanismi di bioaccumulo nei licheni. *Notiziario della Società Lichenologica Italiana*, **16**: 81-85.
- Montero Alvarez A., Estévez Alvarez J.R., Iglesias Brito H., Pérez Arriba O., López Sánchez D. and Wolterbeek H.T. (2006).** Lichen based biomonitoring of air quality in Havana City west side. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **270**(1), 63-67.
- Mukherjee A.B., Kaantee U and Zevenhoven R. (2001).** The effects of switching from coal to alternative fuels on heavy metals emissions from cement manufacturing. Proceeding Of the 6th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. Guelph (ON) Canada, Jul. 29 - Aug 2, pp. 379.
- Nakamoto H. & Hiyama T. (1999).** Heat - shock proteins and temperature stress. In: Pessarakli M. (ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker, New York: 399-416.
- Nash III T.H. (1975).** Influence of the effluents from a zinc factory on lichens. *Ecological Monographs*, **45**: 183-198.
- Nash III T.H. (1996).** *Lichen biology*. Second Edition. Nash III T.H. (ed.), Cambridge University Press, London, pp. 486.
- Nash III T.H. & Sommerfeld M.R. (1981).** Elemental concentration in lichens in the area of the Four Corners Power Plant, New Mexico. *Environmental and Experimental Botany*, **21**(2): 153-162.
- Nash III T.H. & Gries C. (1995).** The use of lichens in atmospheric deposition studies with emphasis on the Arctic. *Science of the Total Environment*, **160/161**, 729-736.
- Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C. and Chambers B.J. (2003).** An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*, **311**(1-3): 205-219.

- Nieboer E. & Richardson D.H.S. (1980).** The replacement of the non-descript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, **1**(B): 3-26.
- Nieboer E. & Richardson D.H.S. (1981).** Lichens as monitors of atmospheric deposition. In: Eisenreich S.J. (ed.), *Atmospheric Pollutants in Natural Waters*. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, pp. 339.
- Nieboer E., Puckett K.J. and Grace B. (1976).** The uptake of nichel by *Umbilicaria muhlenbergii*: a physicochemical process. *Canadian Journal of Botany*, **54**: 724-733.
- Nieboer E.H., Richardson D.H.S., Tomassini F.D. and Grace B. (1977).** Ecological and physicochemical aspects of the accumulation of heavy metals and sulphur in lichens. In: *International Conference on Heavy Metals in the Environment*, Toronto, October 27-31. Symposium Proceedings, Vol. 2, part II, 331-351.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. and Tomassini F.D. (1978).** Mineral uptake and release by lichens: An overview. *The Bryologist*, **81**(2): 226-246.
- Nimis P.L. (1986).** Urban lichen studies in Italy. II. The town of Udine. *Gortania*, **7**: 147-172.
- Nimis P.L. (1990).** Air Quality Indicators and Indices. The use of plants as bioindicators and biomonitors of air pollution. In: Colombo A., Premazzi G. (eds.), *Proceedings International Workshop on Indicators and Indices*, JRC Ispra, EUR 13060 EN: 93-126.
- Nimis P.L. (2000).** Checklist of the Lichens of Italy 2.0., University of Trieste, Dept. of Biology, IN2.0/2 (<http://dbiodbs.univ.trieste.it/>).
- Nimis P.L. & Tretiach M. (1987).** I licheni nell'area urbana di Roma. In: Bonnes M. (ed.), *Urban ecology applied to the city of Rome*. UNESCO/MAB Pr. 11, Pr. Rep. 3: 161-168.
- Nimis P.L. & Bargagli R. (1999).** Linee-guida per l'utilizzo di licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. In: *Atti del Workshop Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale*, Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA-Serie Atti, 1999: 279-289.
- Nimis P.L., Bargagli R., Benedet A., Castello M., Ciccarelli A., Gasparo D., Lausi D., Lazzarin G., Olivieri S. and Tretiach M. (1989).** I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico nell'area di Schio-Thiene-Breganze (Vicenza). *Atti del Museo Civico di Storia Naturale di Verona*, **16**: 1-154.
- Nimis P.L., Castello M. and Perotti M. (1991).** Lichens as biomonitor of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). *The Lichenologist*, **22**(3): 333-344.

- Nimis P.L., Castello M. and Perotti M. (1993).** Lichens as bioindicators of heavy metal pollution: a case study at La Spezia (Italy). *In: Markert B. (ed.), Plants as Biomonitors, Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment.* VCH, Weinheim and New York, pp. 265-284.
- Nimis P.L., Lazzarin A., Gasparo G. and Gasparo D. (1996).** Biomonitoring of SO₂ and metal pollution with lichens in the Province of Treviso (NE Italy). *In: Azzoni R., De Marco N., Sansoni G. (eds.), Dalla Tossicologia alla Ecotossicologia,* Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale, Pordenone: 9-27.
- Nimis P.L., Skert N. and Castello M. (1999).** Biomonitoraggio di metalli in traccia tramite licheni in aree a rischio del Friuli - Venezia - Giulia. *Studia Geobotanica*, **18**: 3-49.
- Nimis P.L., Ianesch L., Rucli A. and Skert N. (2001).** La qualità dell'aria in Provincia di Gorizia. Licheni come sentinelle ambientali. *Laboratorio dell'Immagine Scientifico*, pp. 60.
- Nylander W. (1866).** Les lichens du Jardin du Luxembourg. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **13**: 364-372.
- Olowoyo J.O., van Heerden E. and Fischer J.L. (2011).** Trace element concentration from lichen transplants in Pretoria, South Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, **18**(4): 663-668.
- Osuji G.O., Braithwaite C., Pointer R. and Reyes J. (1999).** Pesticide inactivation of peanut glutamate dehydrogenase: biochemical basis of the enzyme's isomerization. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, **47**: 3345-3351.
- Pacheco A.M.G., Freitas M.C., Baptista M.S., Vasconcelos M.T.S.D. and Cabral J.P. (2008).** Elemental levels in tree-bark and epiphytic-lichen transplants at a mixed environment in mainland Portugal, and comparisons with an in situ lichen. *Environmental Pollution*, **151**(2): 326-333.
- Palmqvist K., Samuelsson G. and Badger M.R. (1994).** Photobiont-related differences in carbon acquisition among green-algal lichens. *Planta*, **195**(1): 70-79.
- Paoli L., Pirintos S.A., Kotzabasis K., Piasani T., Navakoudis E. and Loppi S. (2010a).** Effects of ammonia from livestock farming on lichen photosynthesis. *Environmental Pollution*, **158**(6): 2258-2265.
- Paoli L., Piasani T., Guttová A., Sardella G. and Loppi S. (2010b).** Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: relationship with the lichen diversity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**(4): 650-657.

- Pawlik-Skowrońska B., Sanità Di Toppi L., Favali M.A., Fossati F., Pirszel J. and Skowroński T. (2002).** Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist*, **156**: 95-102.
- Pawlik-Skowrońska B., Purvis O.W., Pirszel J. and Skowroński T. (2006).** Cellular mechanisms of Cu-tolerance in the epilithic lichen *Lecanora polytropa* growing at a copper mine. *The Lichenologist*, **38**: 267-275
- PC-ORD 4 User Guide (1999).** MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon.
- Pearson L.C. & Henriksson E. (1981).** Air pollution damage to cell membranes in lichens. II. Laboratory experiments. *The Bryologist*, **84**(4): 515-520.
- Perales-Vela H.V., Pena-Castro J.M. and Canizares-Villanueva R.O. (2006).** Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, **64**(1): 1-10.
- Pihlstrom M. (1982).** Kalkstensdammets inverkan pa epifytiska lavar i Kalstrand, Sibbo (Sydfinland). *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica*, **58**: 102-112.
- Pihlstrom M. (1987).** The influence of airborne limestone dust on epiphytic lichens in southern Finland. *International Botanical Congress Abstracts*, **14**: 420.
- Pisani T., Munzi S., Paoli L, Bačkor M. and Loppi S. (2010).** Physiological effects of arsenic on the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. *Chemosphere*, **82**(7), 963-969.
- Puckett K.J. (1976).** The effect of heavy metals on some aspects of lichen physiology. *Canadian Journal of Botany*, **54**(23): 2695-2703.
- Punz W. (1979).** The effect of single and combined pollutants on lichen water content. *Biologia Plantarum*, **21**: 472-474.
- Ra H.S.Y., Geiser L.H. and Crang R.F.E. (2005).** Effects of season and low-level of air pollution on physiology and element content of lichens from the US Pacific Northwest. *Science of the Total Environment*, **343**(1-3): 155-167.
- Rauser W. (1995).** Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology*, **109**: 1141-1149.
- Recchia F., Castello M. and Gasparo D. (1993).** Biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico tramite licheni nella provincia di Pescara. *Studia Geobotanica*, **13**: 313-348.
- Reis M.A., Alves L.C., Freitas M.C., Van Os B., Wolterbeek H.T. (1999).** Lichens (*Parmelia sulcata*) time response model to environmental elemental availability. *Science of the Total Environment*, **232**(1): 105-115.
- Reisman J.I. & Pechan E.H. (1997).** Air emissions from scrap tire combustion. EPA-600/R-97-115.
- Richardson D.H.S., Nieboer E., Lavoie P. and Padovan D. (1979).** The role of metal ion binding in modifying the toxic effect of sulphur dioxide on the lichen

- Umbilicaria muhlenbergii*. II ^{14}C fixation studies. *New Phytologist*, **82**(3): 633-643.
- Rodó X., Giralt S., Burjachs F., Comín F.A., Tenorio R.G. and Julià R. (2002).** High-resolution saline lake sediments as enhanced tools to relate proxy paleolake records and recent climatic data series. *Sedimentary Geology*, **148**: 203-220.
- Ronen R. & Galun M. (1984).** Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*, **24**(3): 239-245.
- Roorda-Knape M.C., Janssen II N.A., De Hartog J.J., van Vliet P.H.N., Harssema H. and Brunekreef B. (1998).** Air pollution from traffic in city districts near major motorways. *Atmospheric Environment*, **32**(11): 1921-1930.
- Rucińska R. & Gwóźdź E.A. (2005).** Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots. *Biologia Plantarum*, **49**(4): 617-619.
- Rusu A.M., Jones G.C., Chimonides P.D.J. and Purvis O.W. (2006).** Biomonitoring using the lichen *Hypogymnia physodes* and bark samples near Zlatna, Romania immediately following closure of a copper ore - processing plant. *Environmental Pollution*, **143**(1): 81-88.
- Sanità Di Toppi L., Musetti R., Marabottini R., Corradi M.G., Vattuone Z., Favalli M.A. and Badiani M. (2004).** Response of *Xanthoria parietina* thalli to environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium. *Functional Plant Biology*, **31**: 329-338.
- Sanità Di Toppi L., Pawlik-Skowrońska B., Vurro E., Vattuone Z., Kalinowska R., Restivo F.M., Musetti R. and Skowroński T. (2008).** First and second line mechanisms of cadmium detoxification in the lichen photobiont *Trebouxia impressa* (Chlorophyta). *Environmental Pollution*, **151**(2): 280-286.
- Schleicher N., Norra S., Chai F., Chen Y. Wang S. and Stuben D. (2010).** Anthropogenic versus geogenic contribution to total suspended particulate matter and its variation during a two-year sampling period in Beijing, China. *Journal of Environmental Monitoring*, **12**(2): 434-442.
- Schöffl F., Prändl R., and Reindl A. (1999).** Molecular responses to heat stress. In: Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, R.G. Landes Co., Austin, Texas, pp. 81–98.
- Schroeter B. (1994).** In situ photosynthetic differentiation of green algal and the cyanobacterial photobiont in the crustose lichen *Placopsis contortuplicata*. *Oecologia*, **98**(2): 212-220.

- Seaward M.R.D. (1979).** Lichens as monitors of environments with decreasing sulphur dioxide levels. *In: Sulphur Emissions and the Environment, Proceedings of International Symposium*, London 8-10 May, 1979. *The Society of Chemical Industry, Water and Environment Group*, London, UK: 255-258.
- Sharma P. & Dubey R.S. (2005).** Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**(1): 35-52.
- Showman R.E. (1981).** Lichen recolonization following air quality improvement. *The Bryologist*, **84**(4): 492-497.
- Silberstein L. & Galun M. (1988).** Spectrophotometric estimation of chlorophyll in lichens containing anthraquinones in relation to air pollution assessments. *Environmental and Experimental Botany*, **28**(2):145-150.
- Simon E.W. (1974).** Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, **73**(3): 377-420.
- Skert N., Miani N., Mariuz M. and Grahonja R. (2006).** Biomonitoraggio dell'inquinamento da gas fitotossici nella Provincia di Trieste tramite licheni come bioindicatori. *Biologi Italiani*, anno XXXVI n° 5, maggio 2006: 65-74.
- Sloof J.E. (1995).** Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplant. *Atmospheric Environment*, **29**(1): 11-20.
- Sloof J.E. & Wolterbeek B.T. (1992).** Lichens as biomonitors for radiocaesium following the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, **16**(3): 229-242.
- Sloof J.E., De Bruin M. and Wolterbeek H.T. (1988).** Critical evaluation of some commonly used biological monitors for heavy metal air pollution. *In: Orio A.A. (ed.), Environmental Contamination: Proceedings of the International Conference*, Venice (Italy), September 1988. CEP Consultants, Edinburgh, UK: 296-298.
- Smith E.C. & Griffiths H. (1996).** The occurrence of the chloroplast pyrenoid is correlated with the activity of a CO₂ - concentrating mechanism and isotope discrimination in lichens and briophytes. *Planta*, **198**: 6-16.
- Stenersen J. (2004).** Chemical Pesticides mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca raton, 276 pp.
- Swietlicki E., Puri S., Hansson H.C. and Edner H. (1996).** Urban air pollution source apportionment using a combination of aerosol and gas monitoring techniques. *Atmospheric Environment*, **30**: 2795-2809.
- Towill L.E. & Mazur P. (1975).** Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Canadian Journal of Botany*, **53**: 1097-1102.

- Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., Giordano S., Modenesi P., Orlando S. and Pittao E. (2007).** Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I. Influence of exposure on sample vitality. *Environmental Pollution*, **146**(2): 380-391.
- Tyler G. (1989).** Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens. *Water, Air, and Soil Pollution*, **47**(3): 321-333.
- Valko M., Morris H. and Cronin M.T.D. (2005).** Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, **12**(10): 1161-1208.
- van Dobben H.F. & de Bakker A.J. (1996).** Re-mapping epiphytic lichen biodiversity in The Netherlands: effects of decreasing SO₂ and increasing NH₃. *Acta Botanica Neerlandica*, **45**(1): 55-71.
- van Dobben H.F., Wolterbeek H.T., Wamelink G.W., Ter Braak C.J. (2001).** Relationship between epiphytic lichens, trace elements and gaseous atmospheric pollutants. *Environmental Pollution*, **112**(2): 163-169.
- van Herk C.M. (2002).** Epiphytes on wayside trees as an indicator of eutrophication in the Netherlands. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), *Monitoring with lichens – Monitoring lichens*. NATO Science Series. IV. Earth and Environmental Sciences, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 285-289.
- Vannini A., Nicolardi V., Tretiach M. and Gaggi C. (2011).** Influenza della temperatura sulle cinetiche di accumulo di Hg⁰ in tre specie licheniche. XXI Congresso della Società Italiana di Ecologia. Palermo, 3-6 Ottobre 2011.
- Vavilin D.V., Ducruet J.M., Matorin D.N., Venediktov P.S. and Rubin A.B. (1998).** Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **42**(3): 233-239.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M. and Foolad M.R. (2007).** Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, **61**(3): 199-223.
- Walther D.A., Ramelow G.J., Beck J.N., Young J.C., Callahan J.D. and Marcon M.F. (1990).** Temporal changes in metal levels of the lichens *Parmotrema praesorediosum* and *Ramalina stenopora*, Southwest Louisiana. *Water, Air, and Soil Pollution*, **53**(1-2): 189-200.
- Wang Y.F., Huang K.L., Li C.T., Mi H.H., Luo J.H. and Tsai P.J. (2003).** Emissions of fuel metals content from a diesel vehicle engine. *Atmospheric Environment*, **37**: 4637-4643.

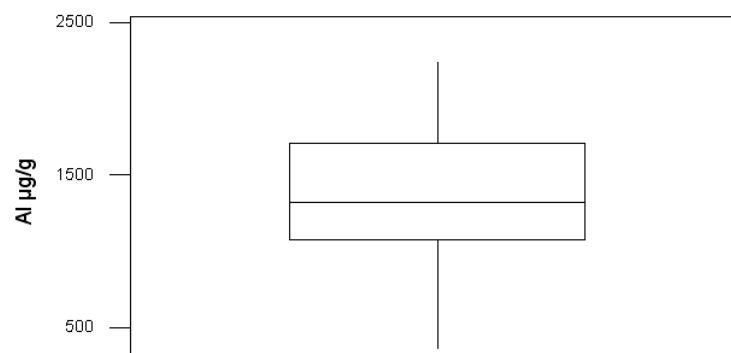
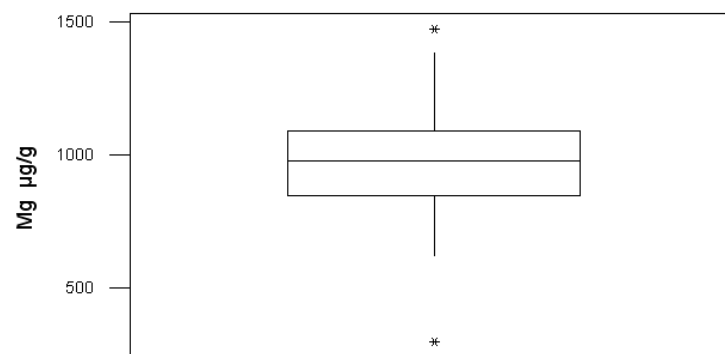
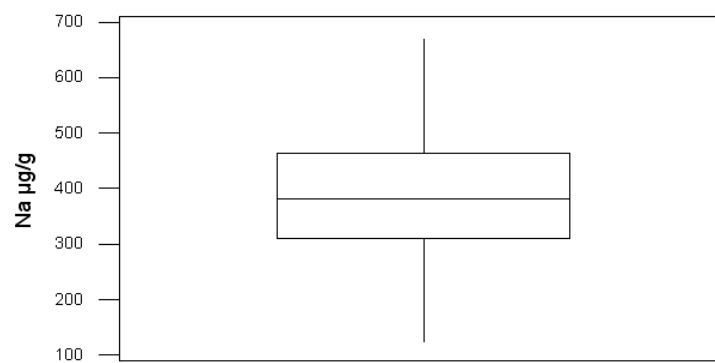
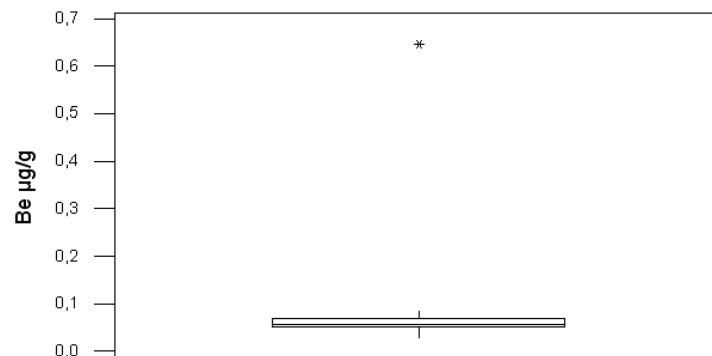
- Wappelhorst O., Kühn I., Oehlmann J. and Market B. (2000).** Deposition and disease: a moss monitoring project as an approach to ascertaining potential connections. *Science of the Total Environment*, **249**(1): 243-256.
- Weckwerth G. (2001).** Verification of traffic emitted aerosol components in the ambient air of Cologne (Germany). *Atmospheric Environment*, **35**(32): 5525-5536.
- Wellburn A.R. (1994).** The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *Journal of Plant Physiology*, **144**(3): 307-313.
- Wietschorke G.M., Lühmann H.-J. and Kreeb K.H. (1990).** Single and combined effects of lead, herbicide and temperature on net photosynthetic rate of *Hypogymnia physodes*, a corticolous lichen. *Photosynthetica*, **24**: 102-109.
- Williamson B.J., Purvis O.W., Mikhailova I., Spiro B. and Udachin V.(2008).** The lichen transplant methodology in the source apportionment of metal deposition around a copper smelter in the former mining town of Karabash, Russia. *Environmental Monitoring and Assessment*, **141**(1-3): 227-236.
- Wittman H. & Turk R. (1988).** Immissionosokologischer Untersuchungen über den epiphytischen Flechtenbewuchs in der Umgebung des Magnesiteswerkes in Hochfilzen (Tirol/Osterreich). *Central Gesamt Fortwesen*, **105**(1): 35-45.
- Wolterbeek B. (2002).** Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution*, **120**(1): 11-21.
- Zambrano García A., Medina Coyotzin C., Rojas Amaro A., López Veneroni D., Chang Martínez L. and Sosa Iglesias G. (2009).** Distribution and sources of bioaccumulative air pollutants at Mezquital Valley, Mexico, as reflected by the atmospheric plant *Tillandsia recurvata* L.. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **9**: 6479-6494.
- Zhang T.L., Gao Y.X., Lu J.F. and Wang K. (2000).** Arsenite, arsenate and vanadate affect human erythrocyte membrane. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **79**(1-4): 195-203.

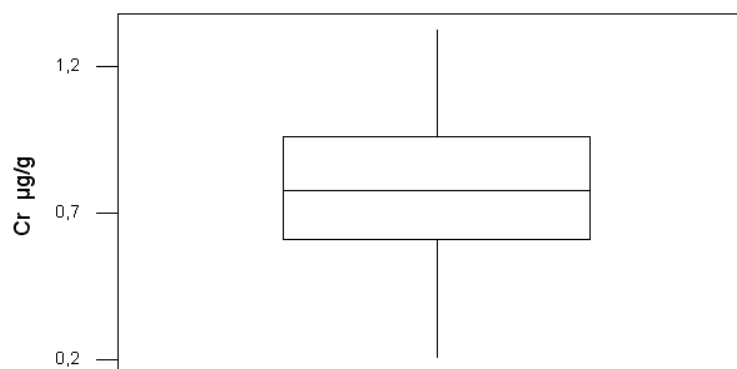
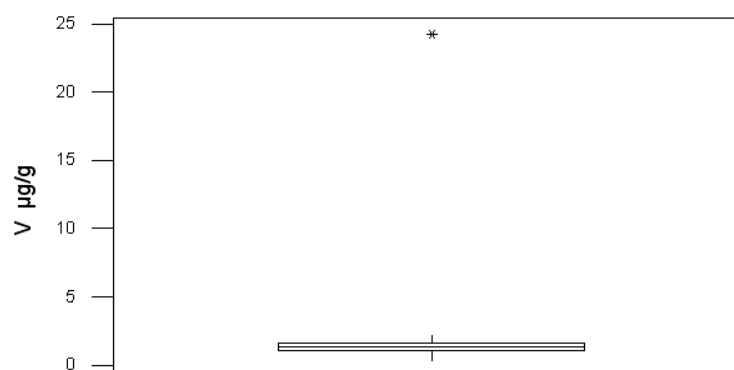
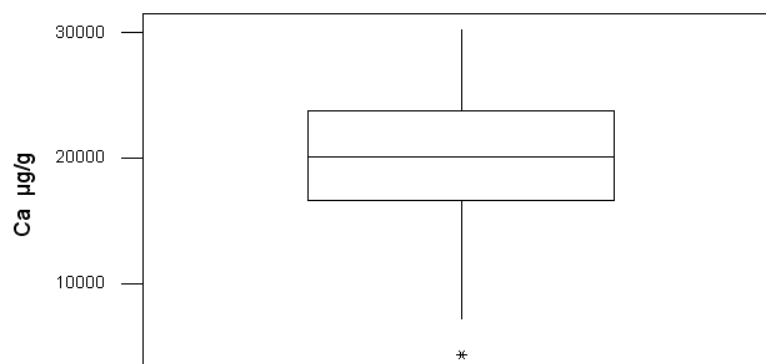
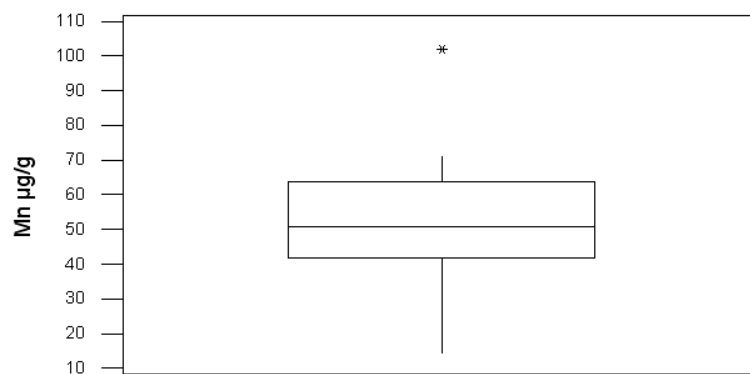
SITOGRAFIA

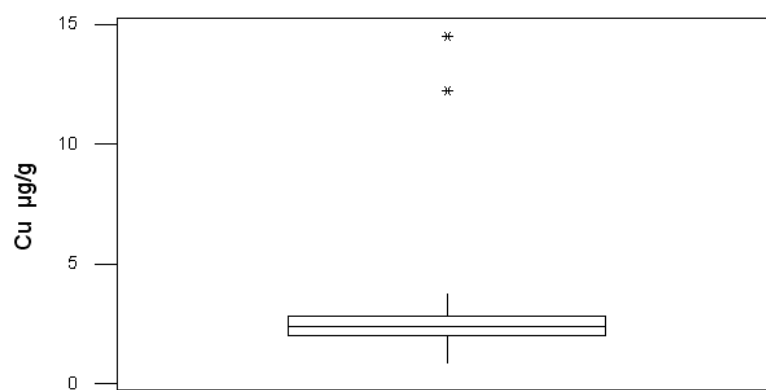
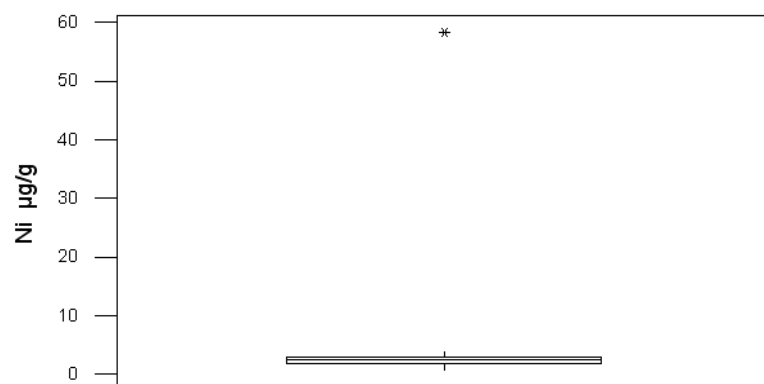
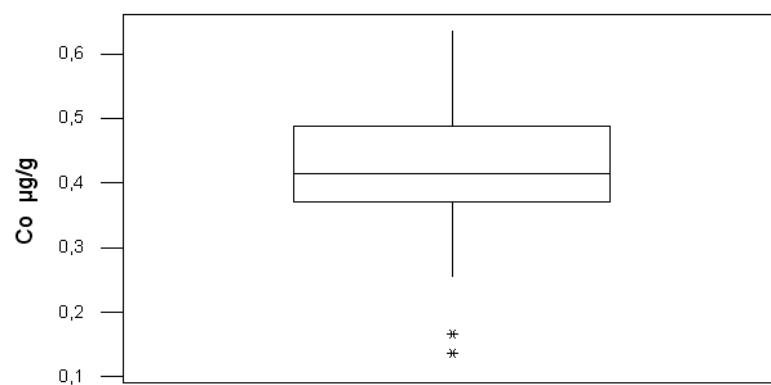
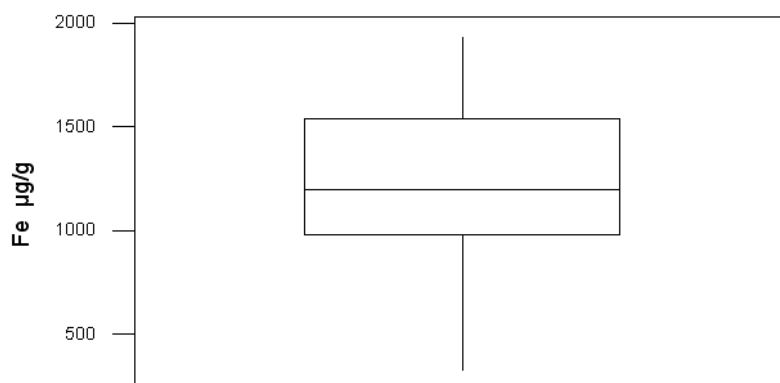
- [1]http://themes.eea.europa.eu/IMS/IMS/ISpecs/ISpecification20080701123452/Assessment1219309276318/view_content
- [2]<http://www.sinanet.apat.it/it/sinanet/sstoriche>
- [3]<http://www.epa.gov/ttnchie1/ap42/ch11/final/c11s06.pdf>
- [4]<http://www.italcementi.it/ITA/Italcementi/>
- [5]<http://agronotizie.imagelinenetwork.com/fertilizzanti/vigneto-e-frutteto-l-importanza-della-concimazione-08114.cfm>
- [6]<http://www.agrolivo.it/fertilizzazione.html>
- [7]<http://www.irri.it/docs/fertilizzazioneazotata.pdf>
- [8]http://www.arpa.veneto.it/glossario_amb/htm/ozono.asp?stampa=si
- [9]http://pcbassam.org/EIAREPORT/Rudradev/09010028_11%20Chapter-6_Risk%20Assessment%20and%20Disaster%20Management%20Plan.pdf

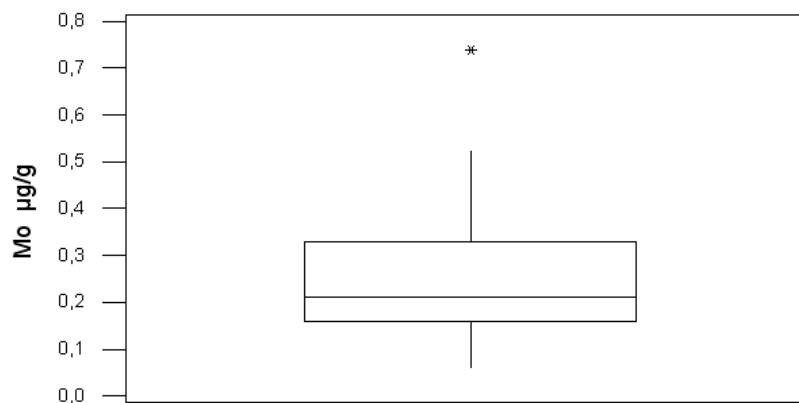
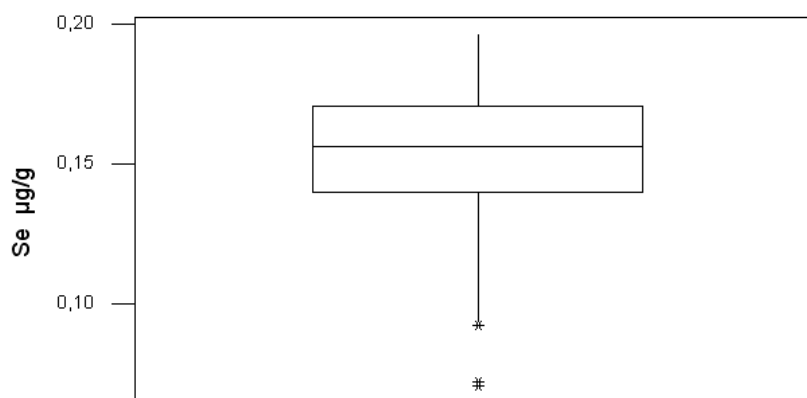
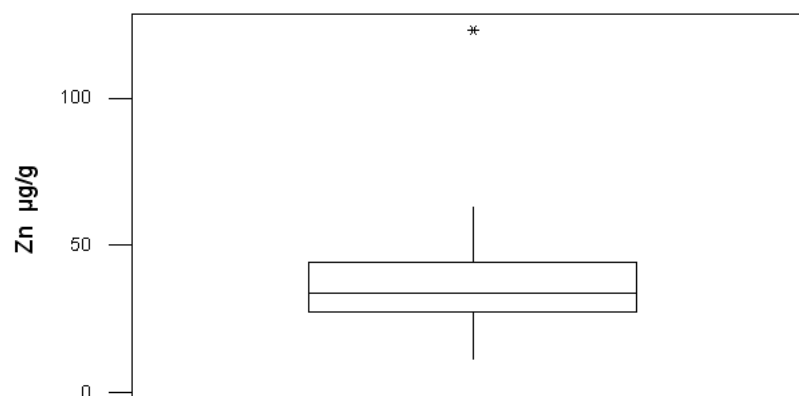
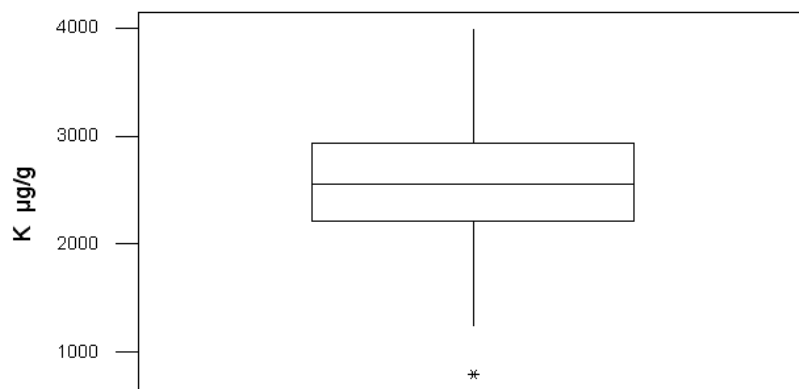
ALLEGATO I

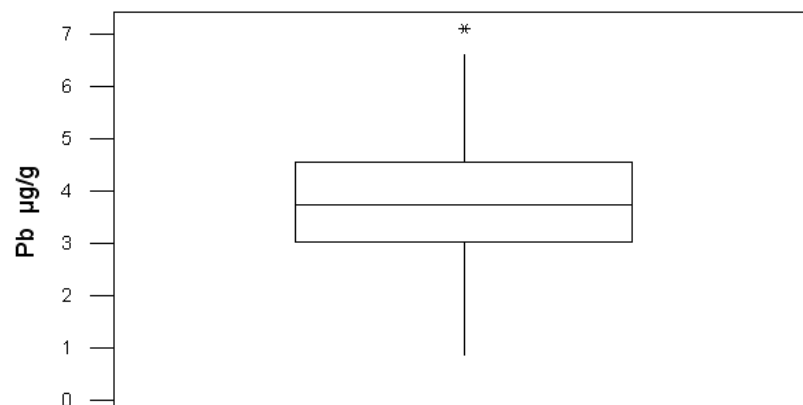
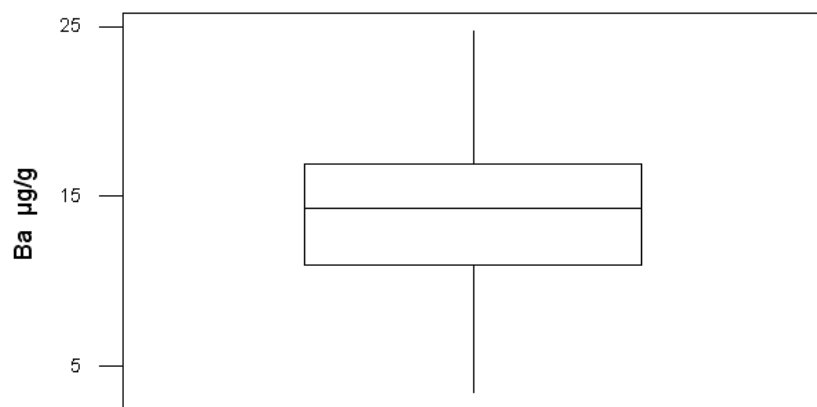
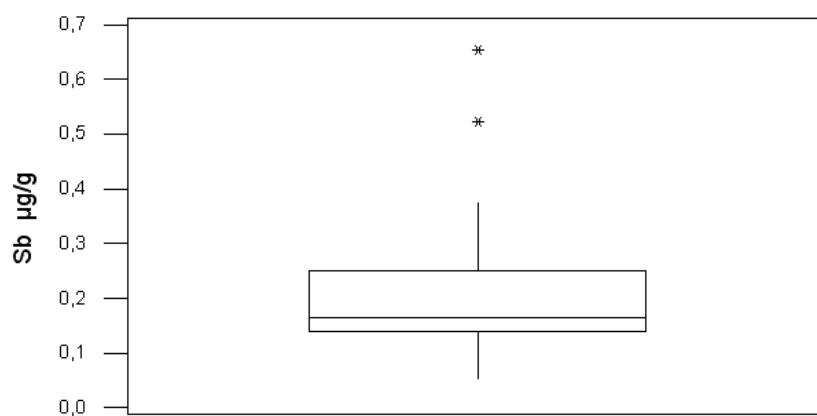
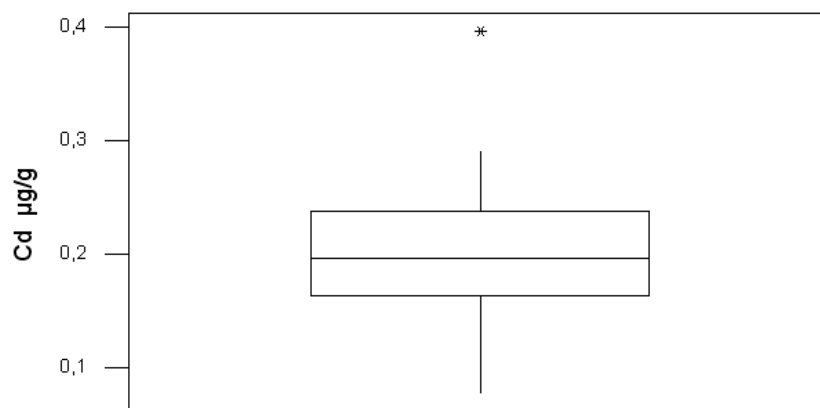
Boxplots relativi alla concentrazione degli elementi in traccia ed ai valori dei parametri ecofisiologici misurati nei talli nei tre trapianti lichenici

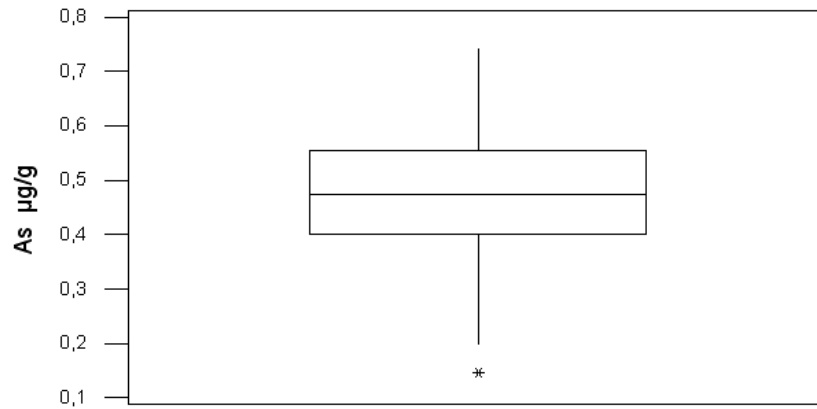
**BOXPLOTS RELATIVI ALLA CONCENTRAZIONE DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA
NEI TALLI DEL PRIMO TRAPIANTO (MAGGIO - LUGLIO 2010)**



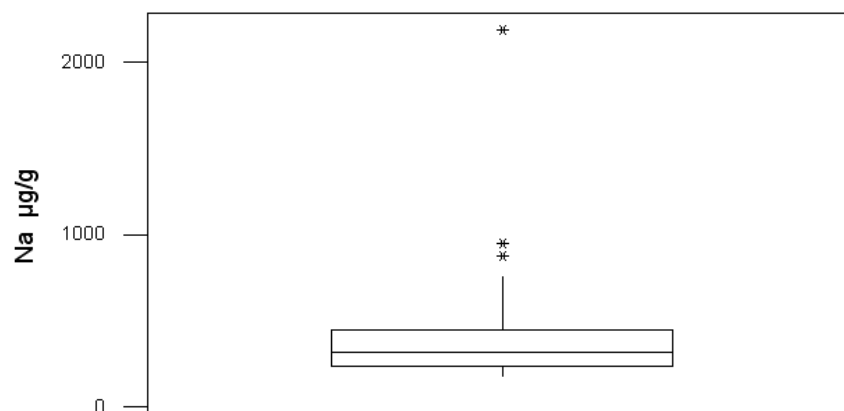
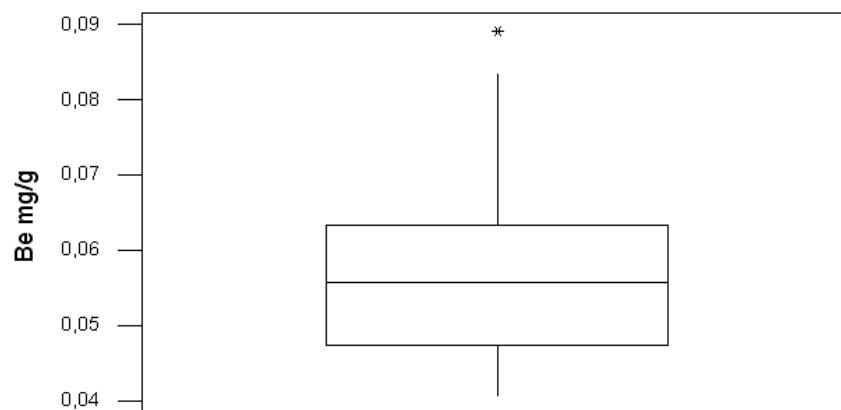


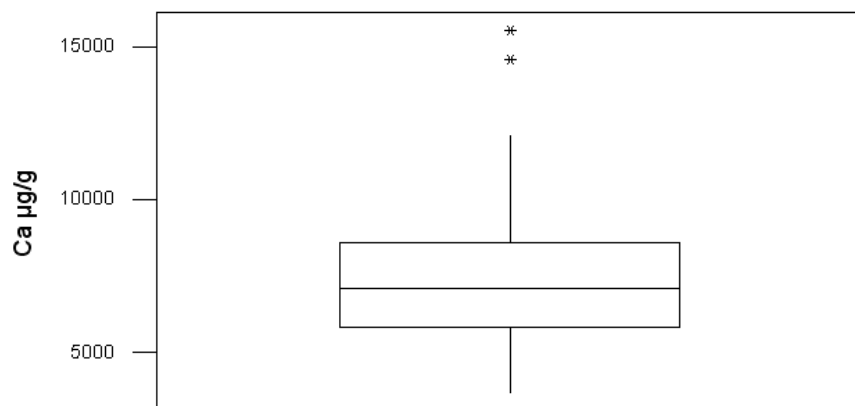
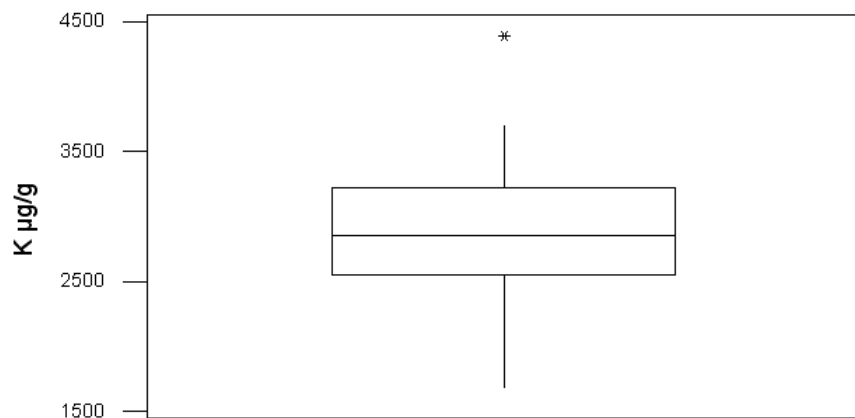
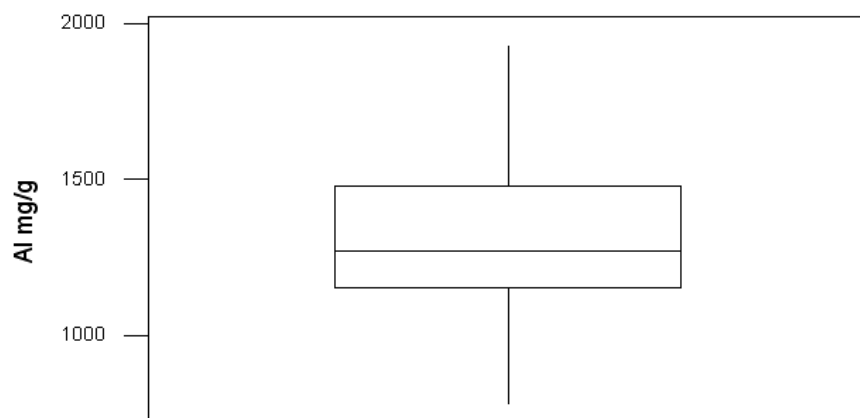
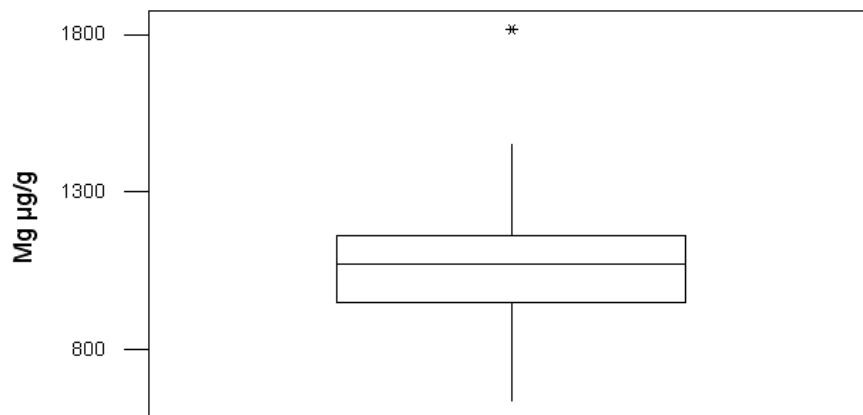


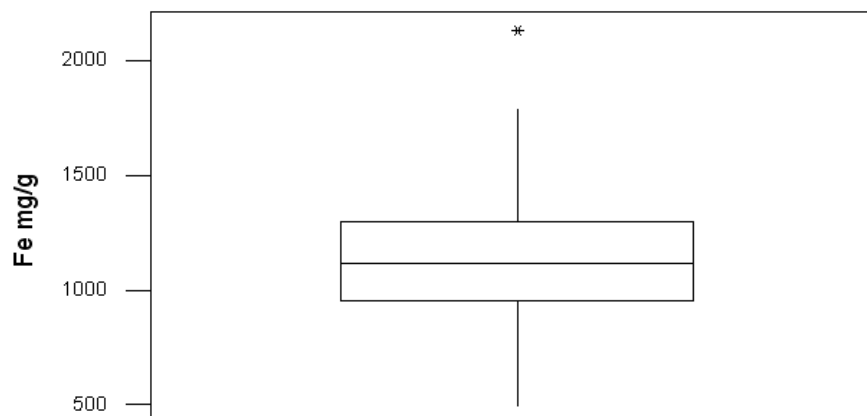
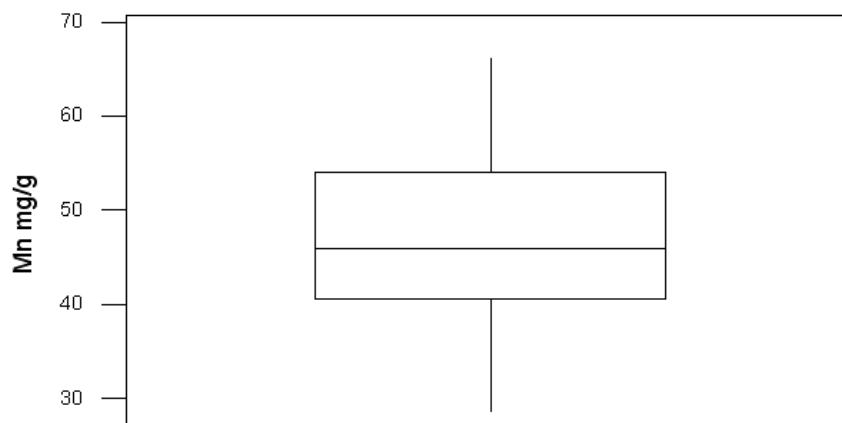
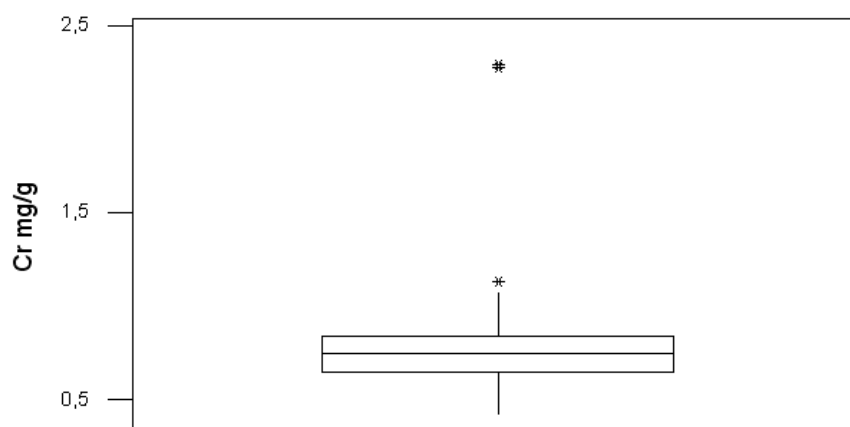
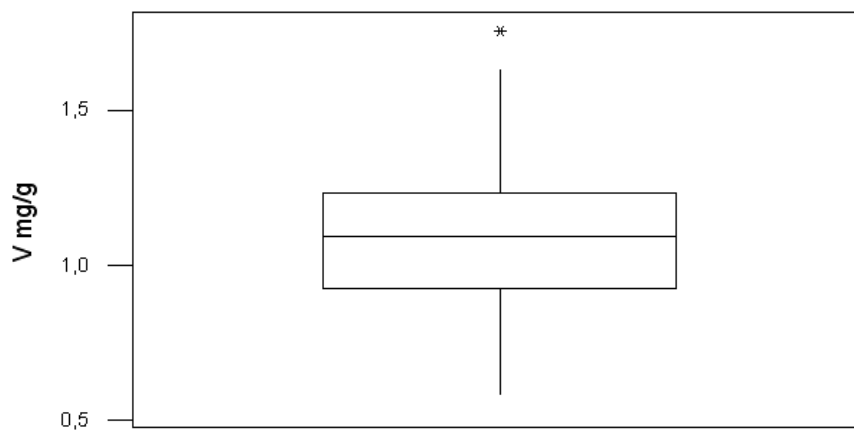


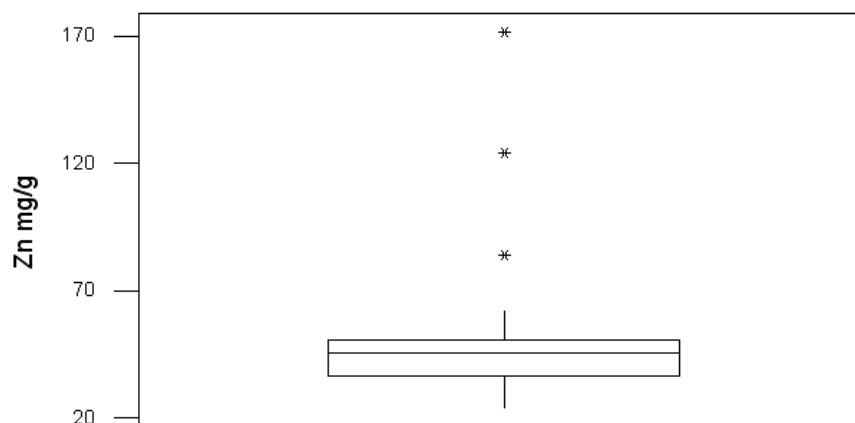
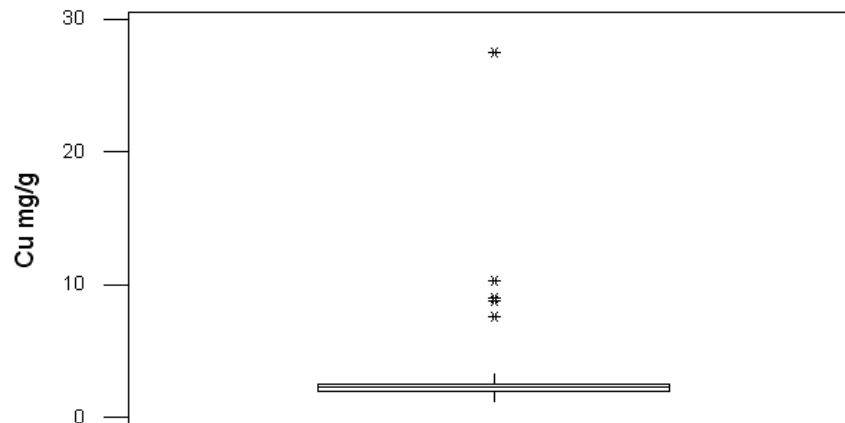
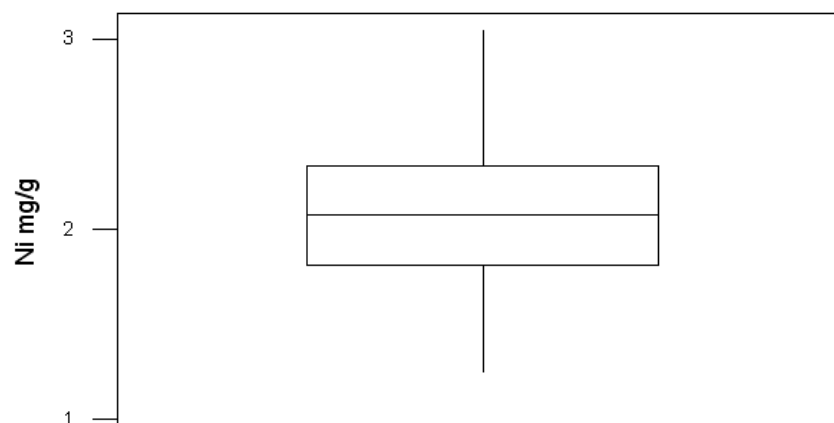
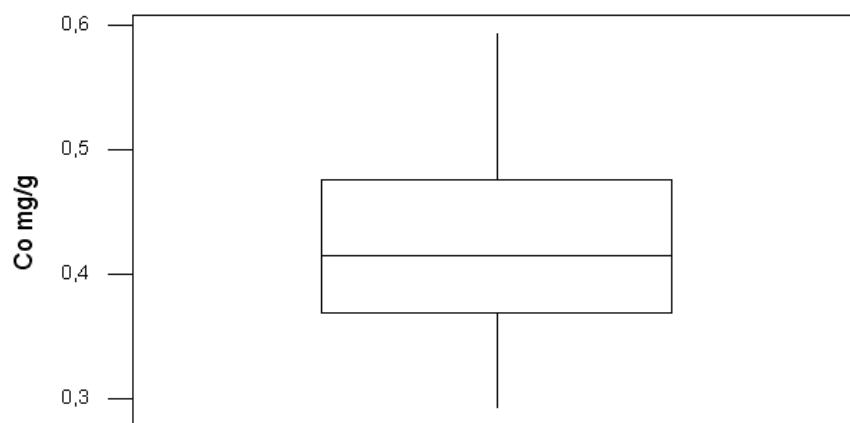


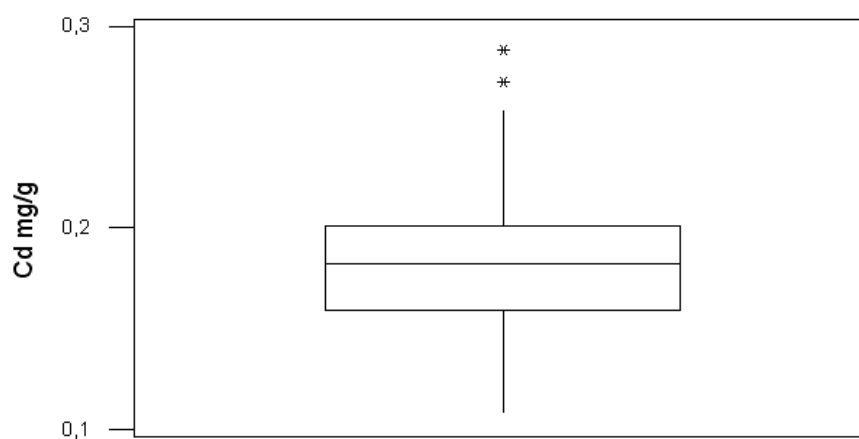
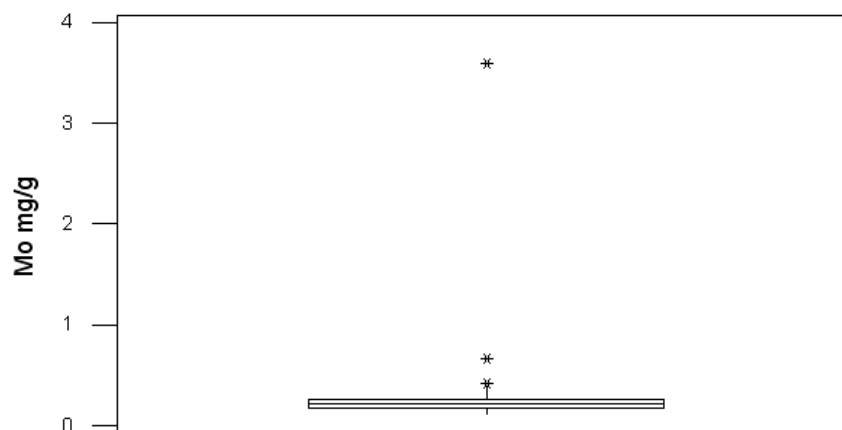
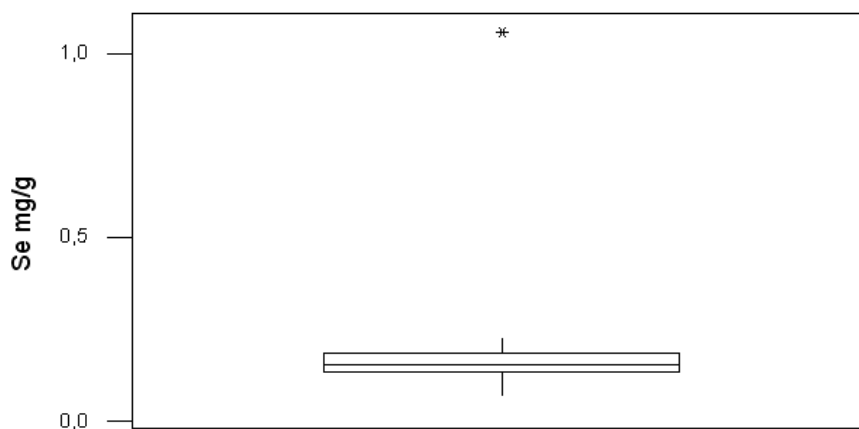
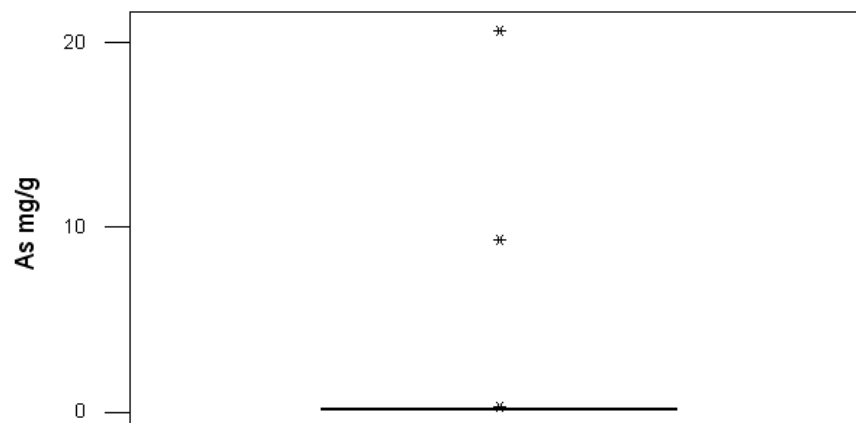
**BOXPLOTS RELATIVI ALLA CONCENTRAZIONE DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA
NEI TALLI DEL TERZO TRAPIANTO (NOVEMBRE - GENNAIO 2011)**

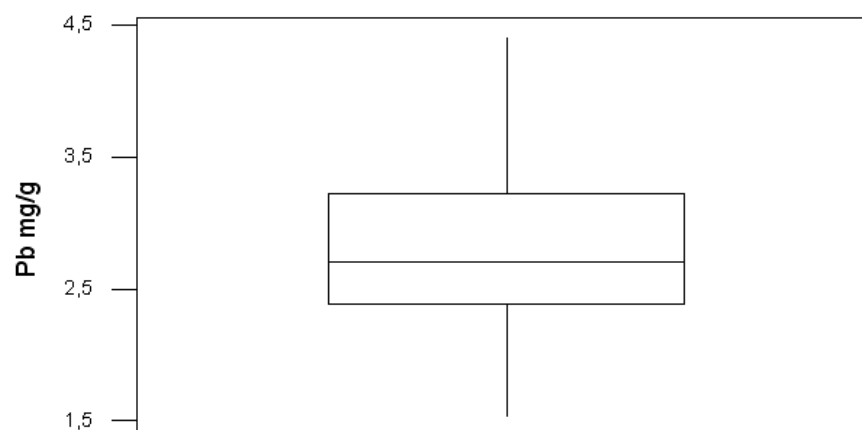
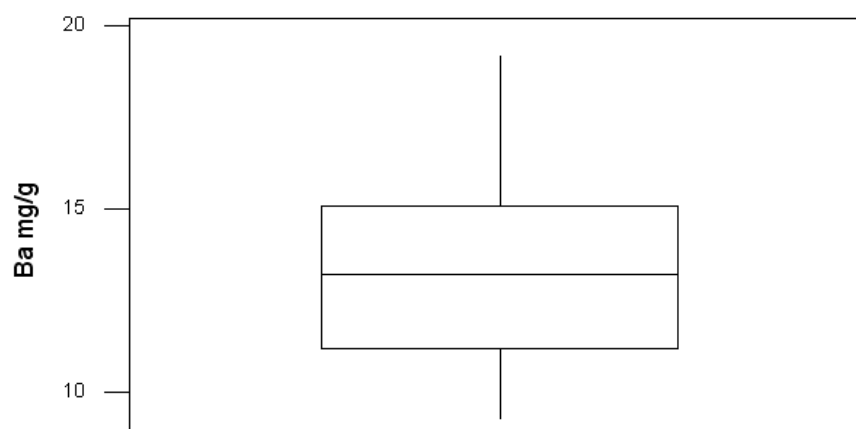
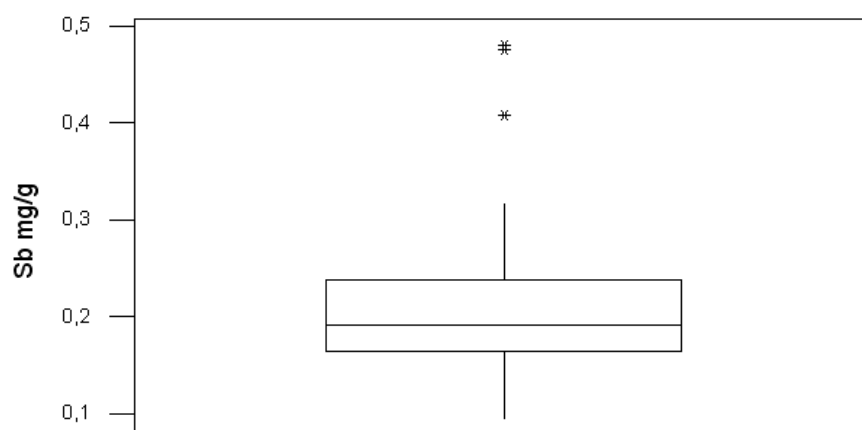


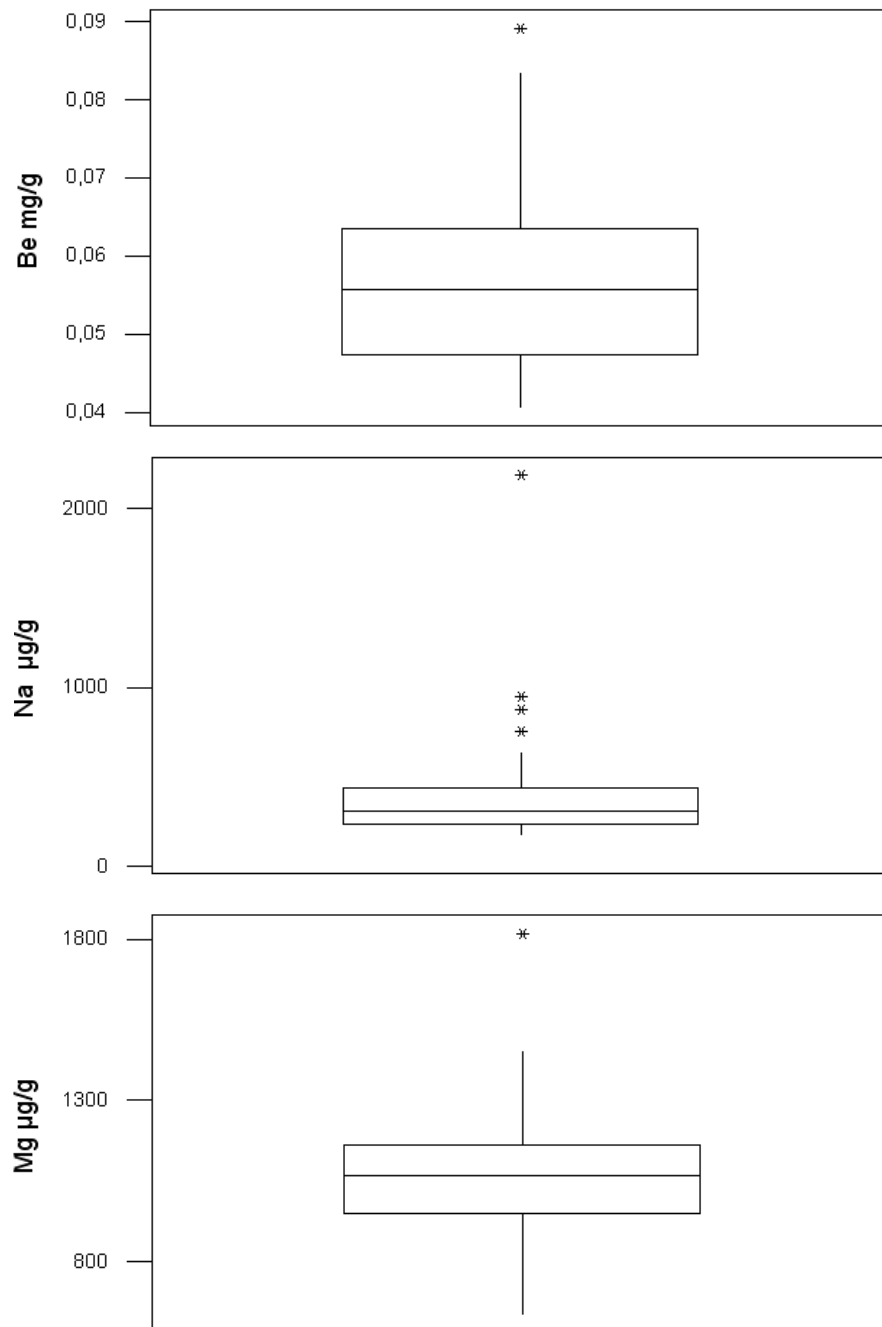


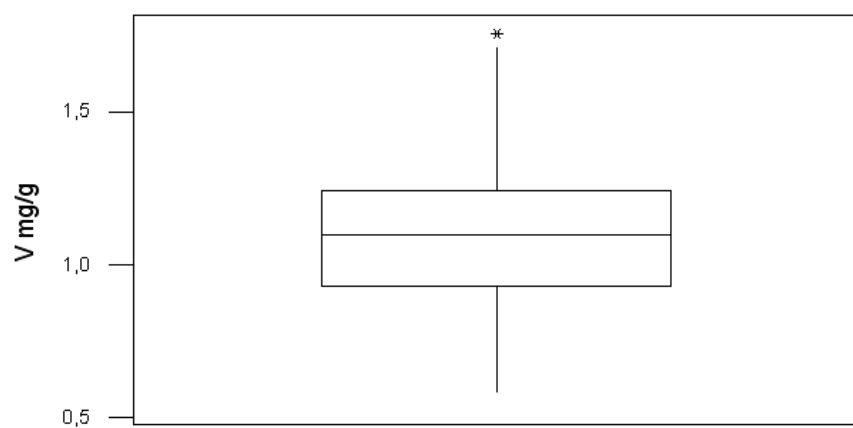
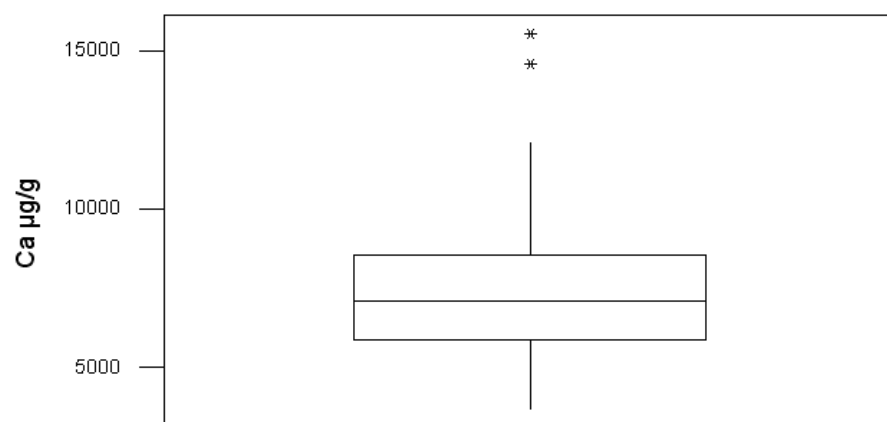
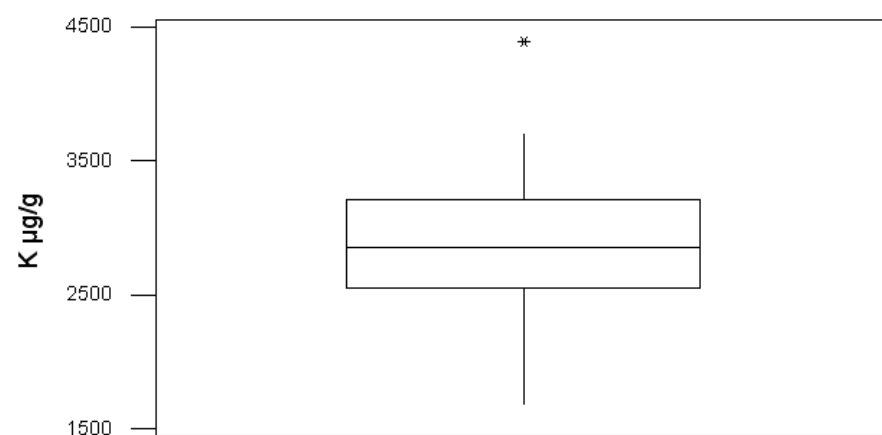
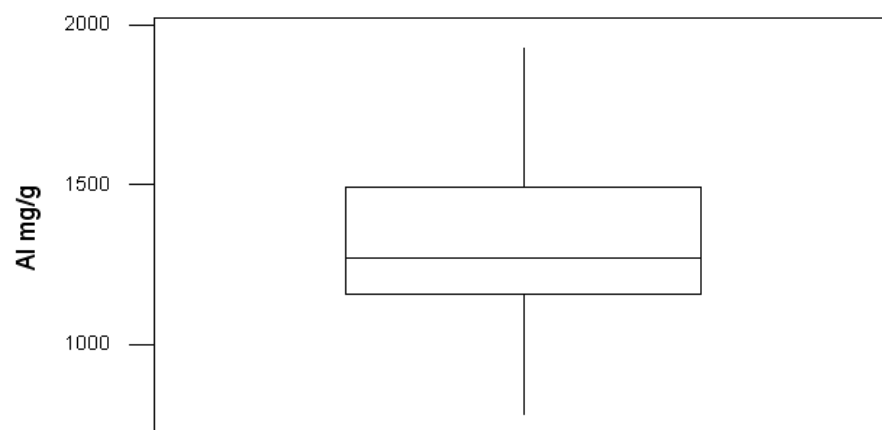


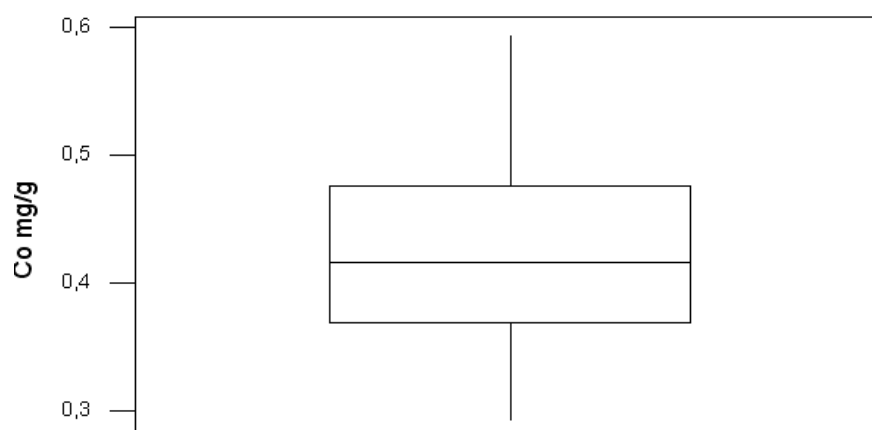
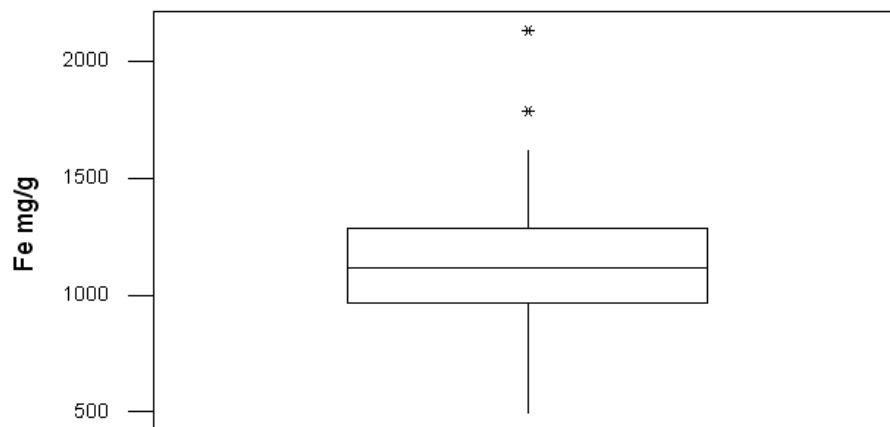
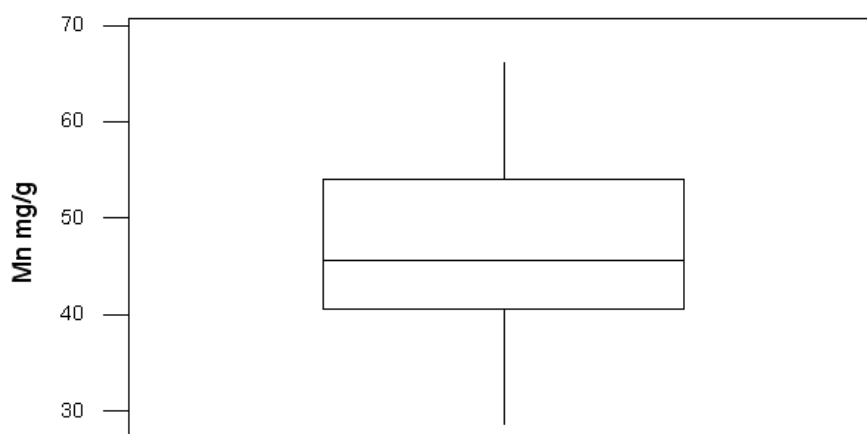
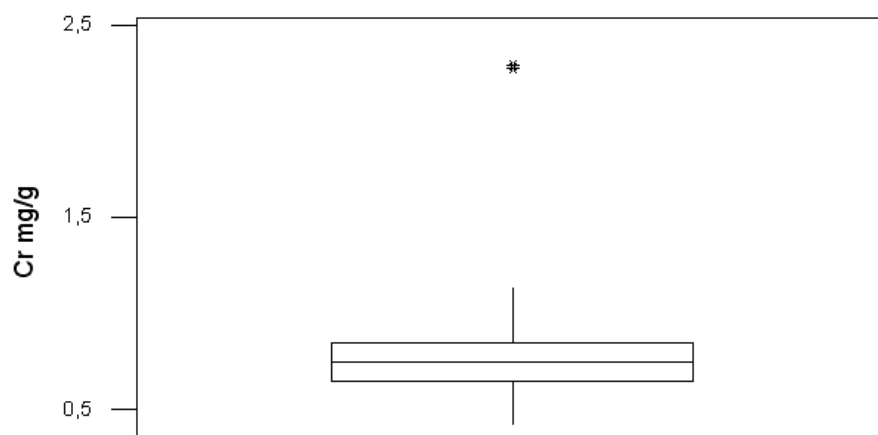


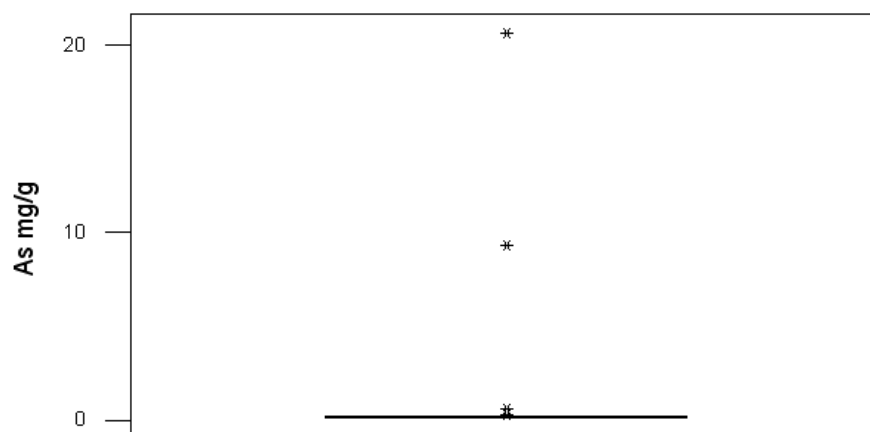
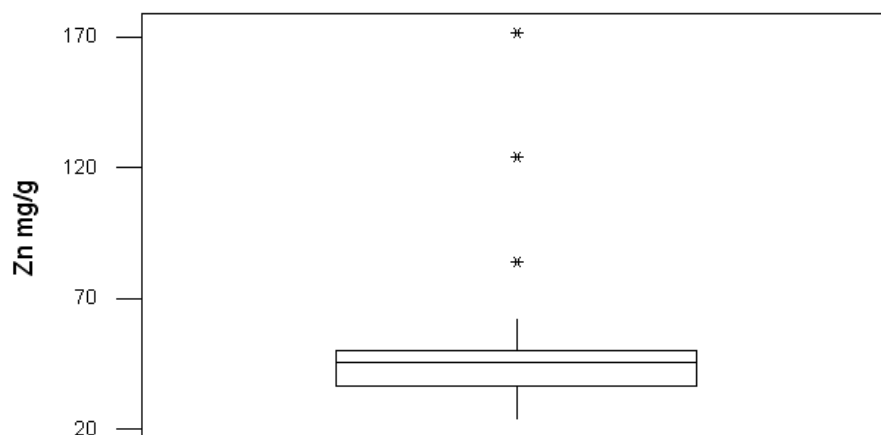
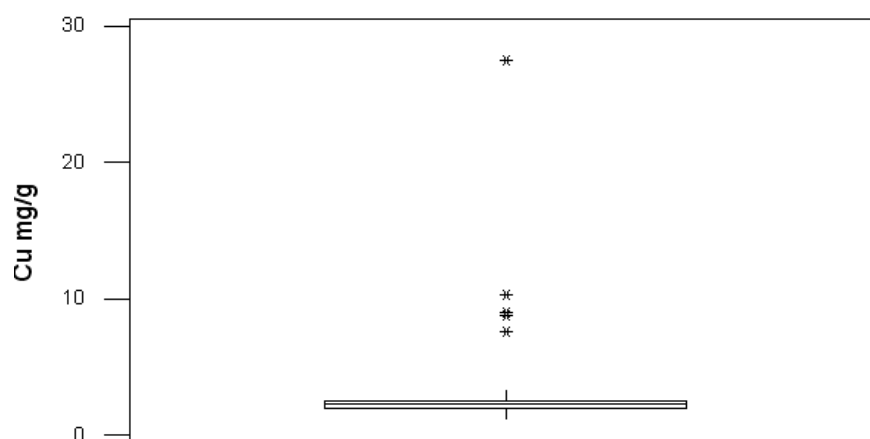
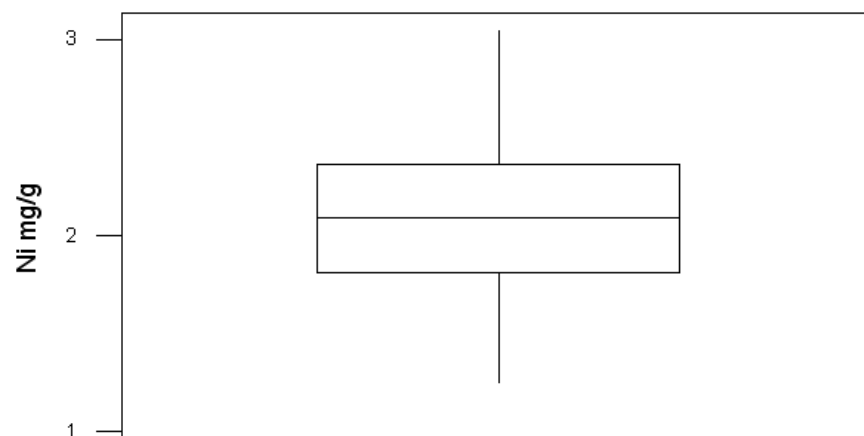


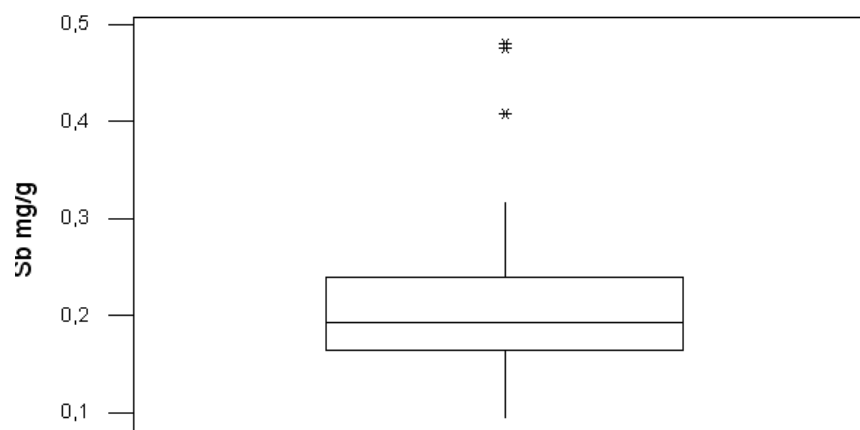
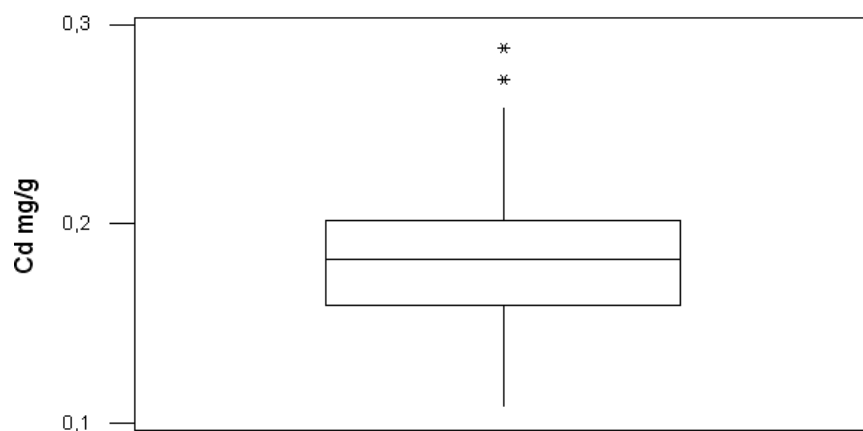
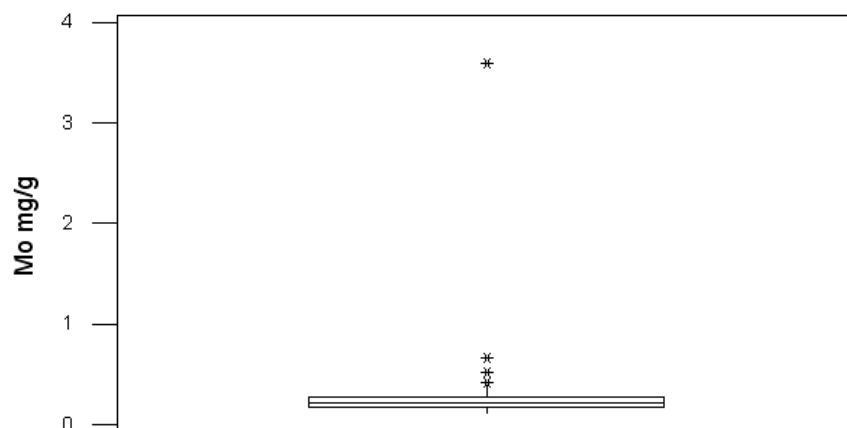
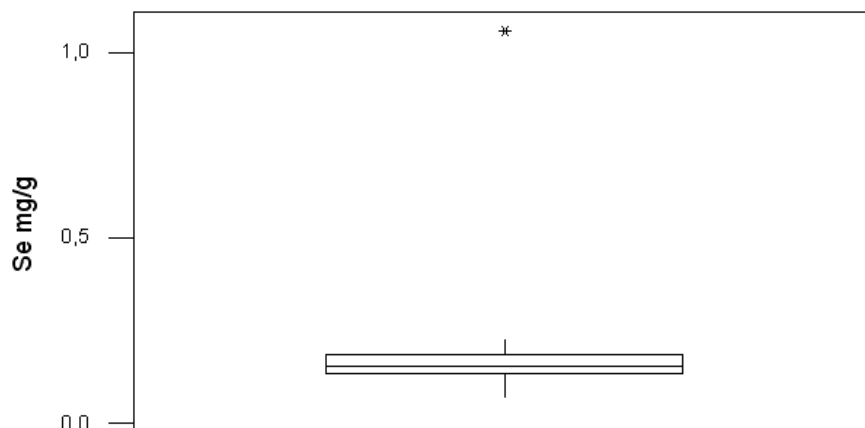


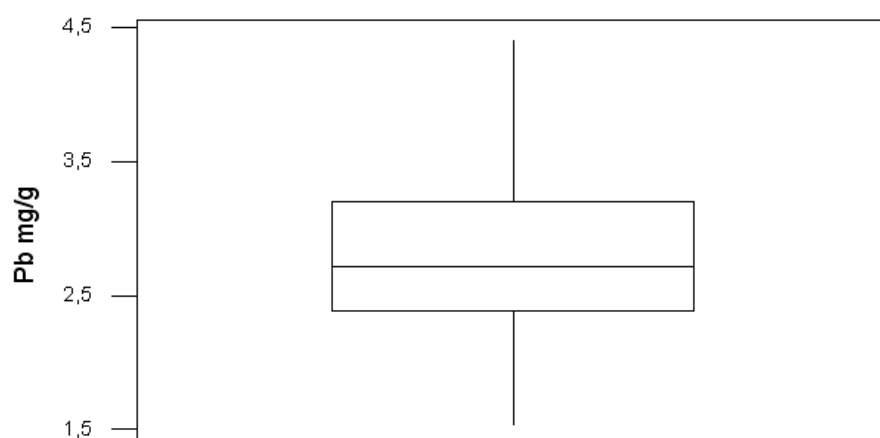
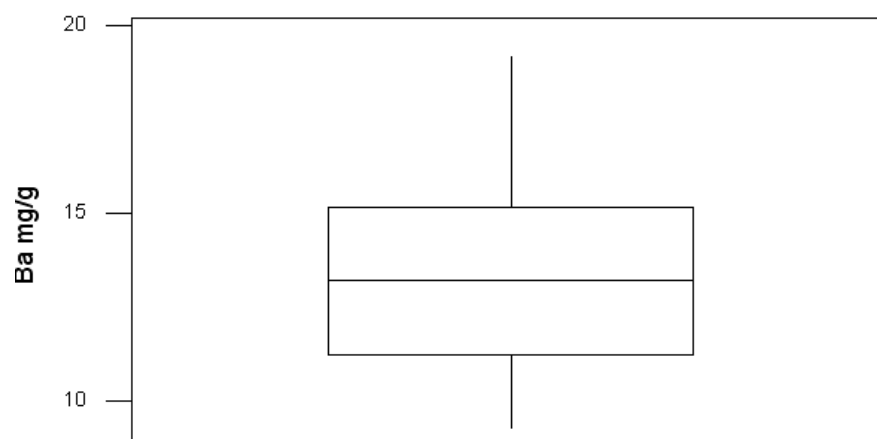
**BOXPLOTS RELATIVI ALLA CONCENTRAZIONE DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA
NEI TALLI DEL QUARTO TRAPIANTO (FEBBRAIO - APRILE 2011)**



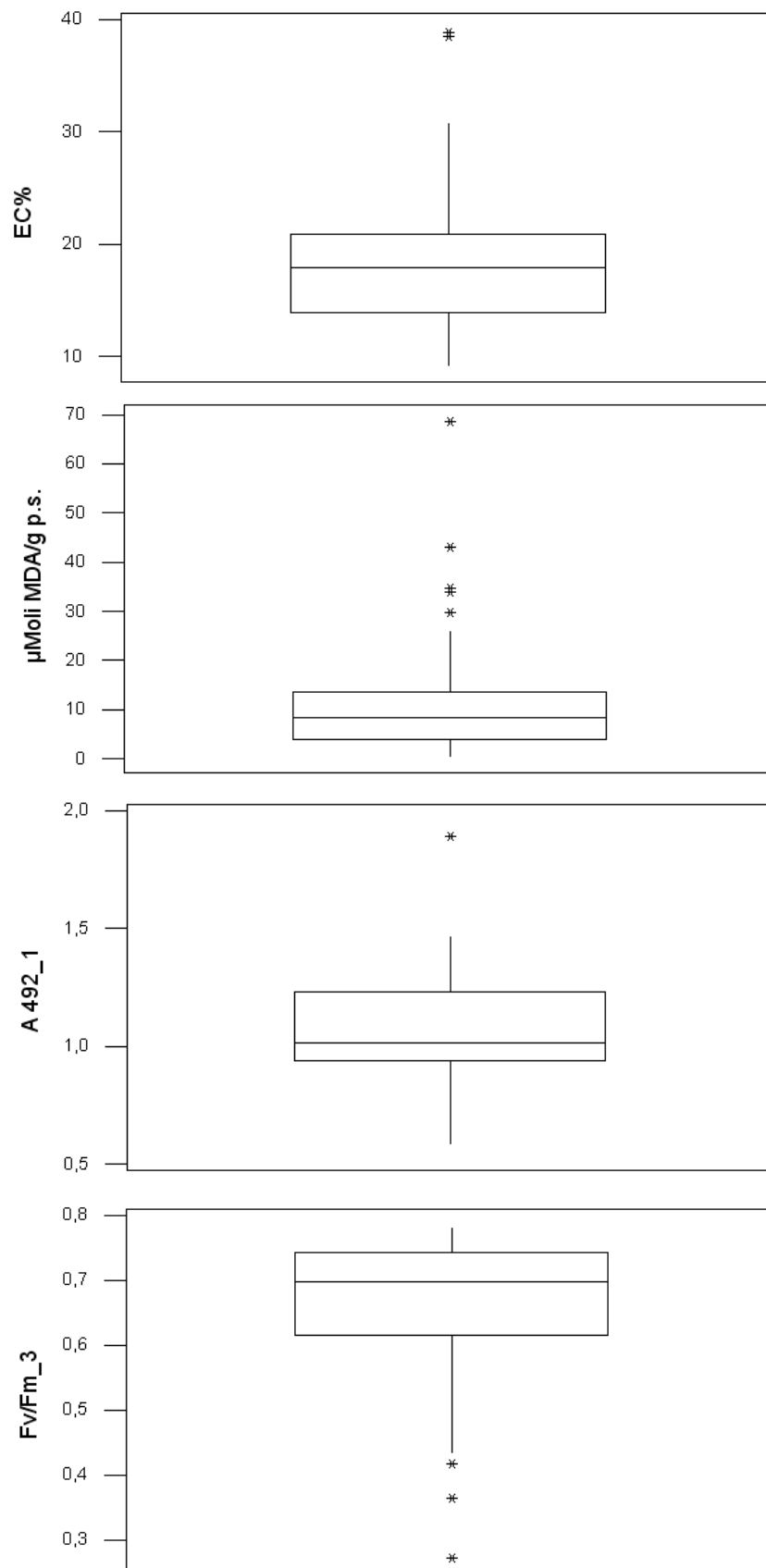


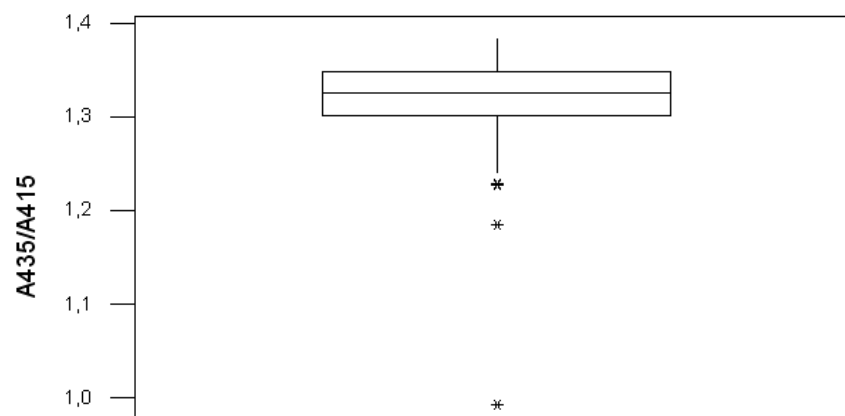
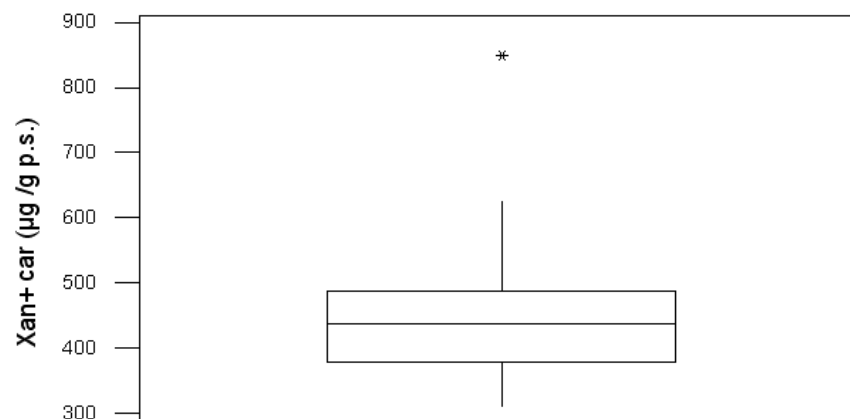
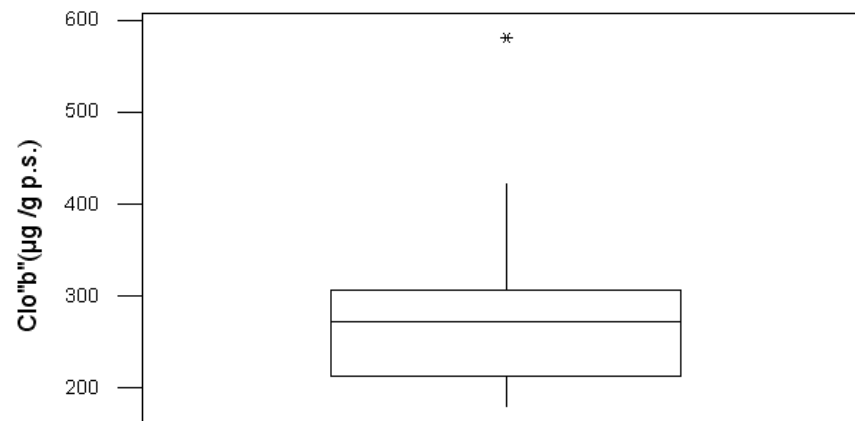
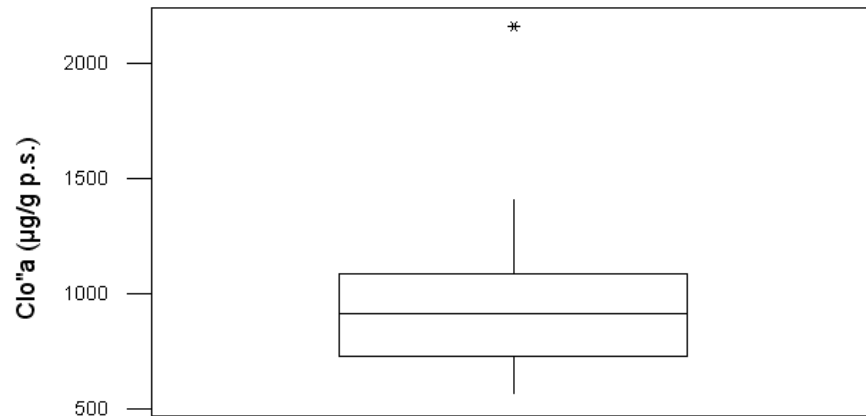




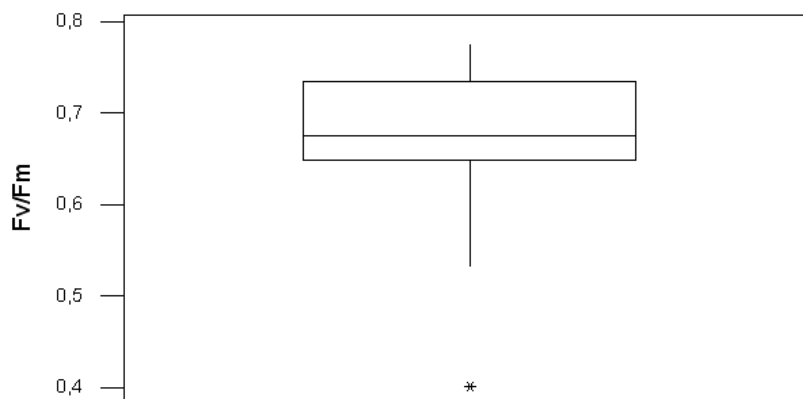
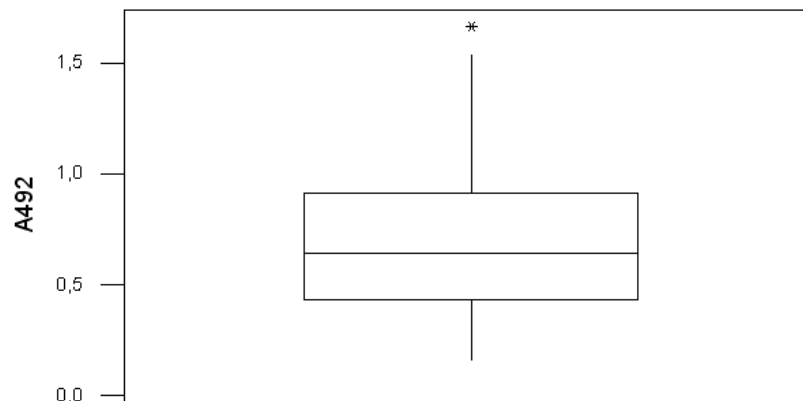
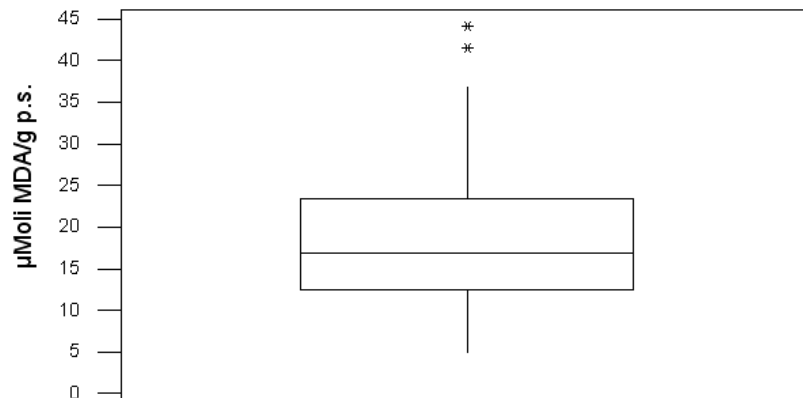
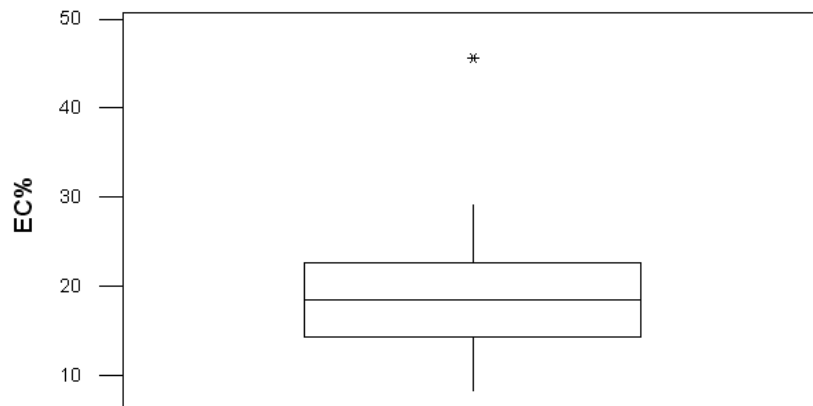


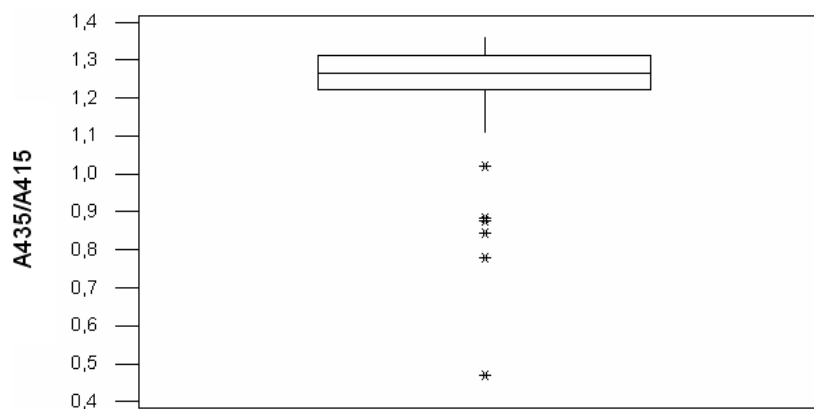
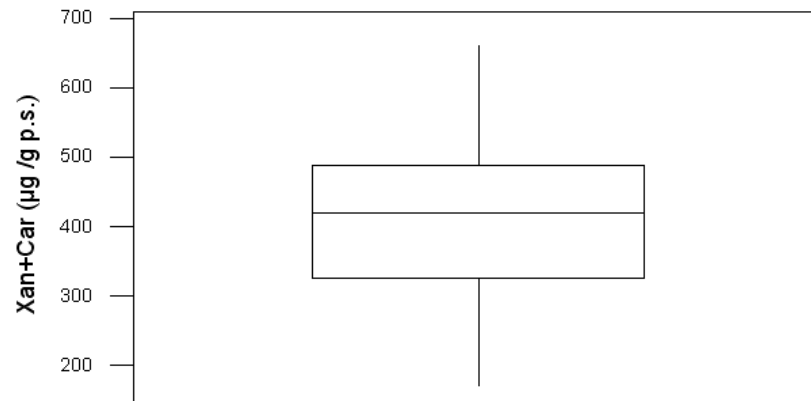
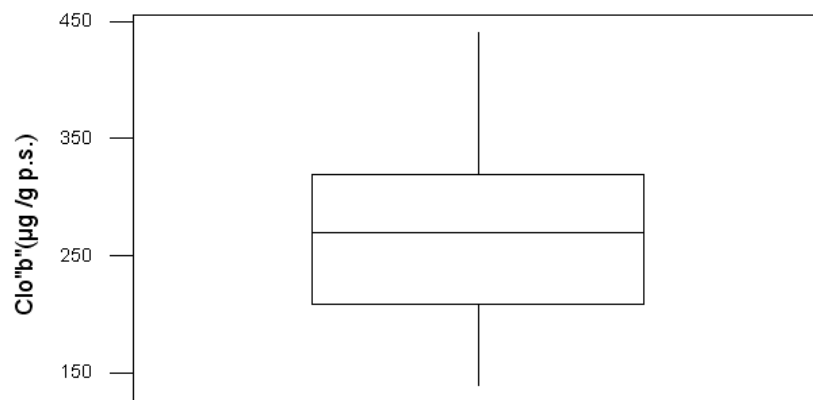
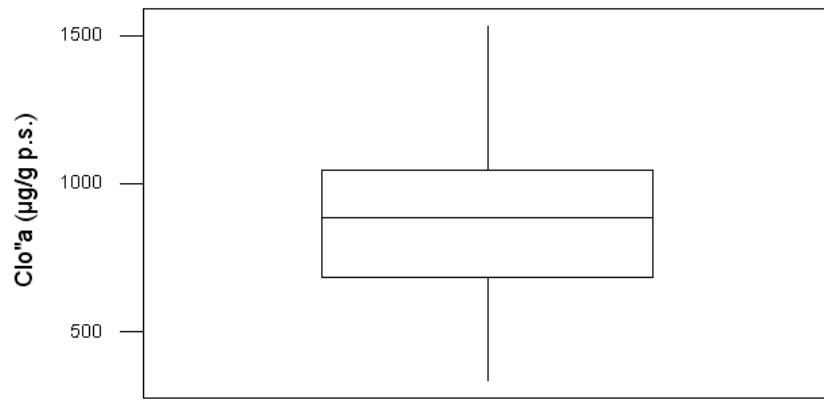
**BOXPLOTS RELATIVI AI VALORI DEI PARAMETRI ECOFISIOLOGICI MISURATI
NEI TALLI DEL PRIMO TRAPIANTO (MAGGIO - LUGLIO 2010)**

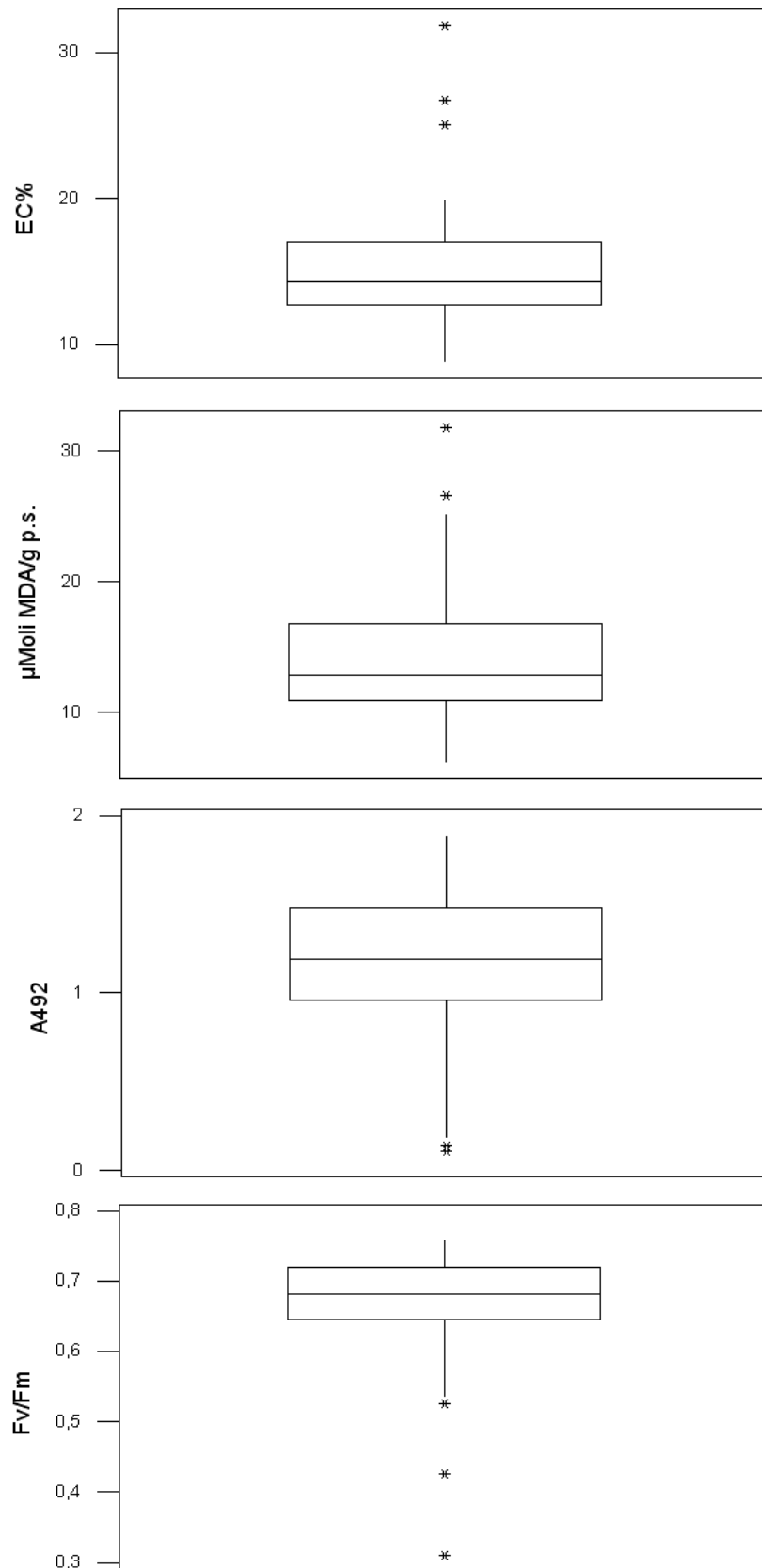


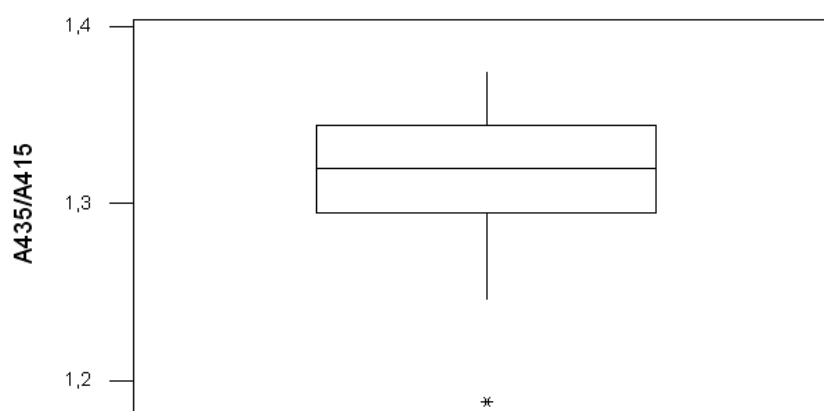
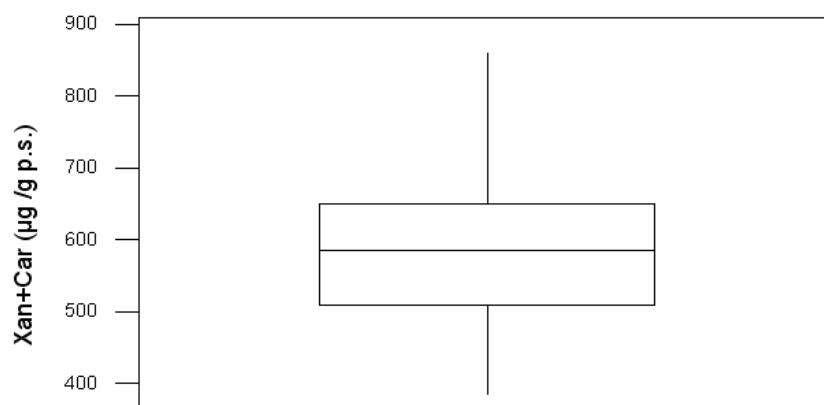
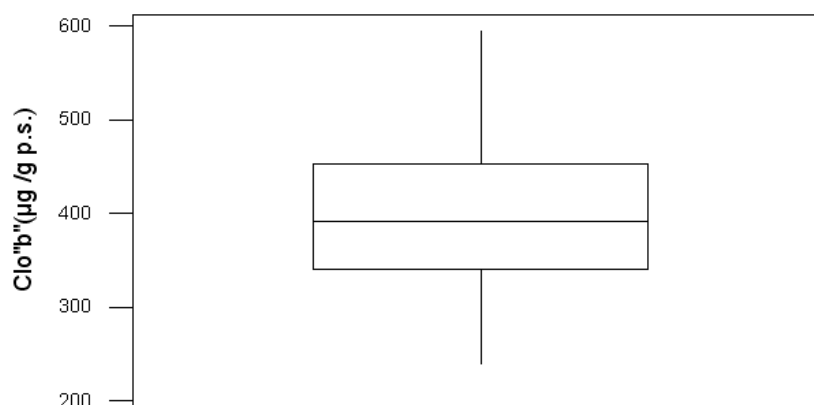
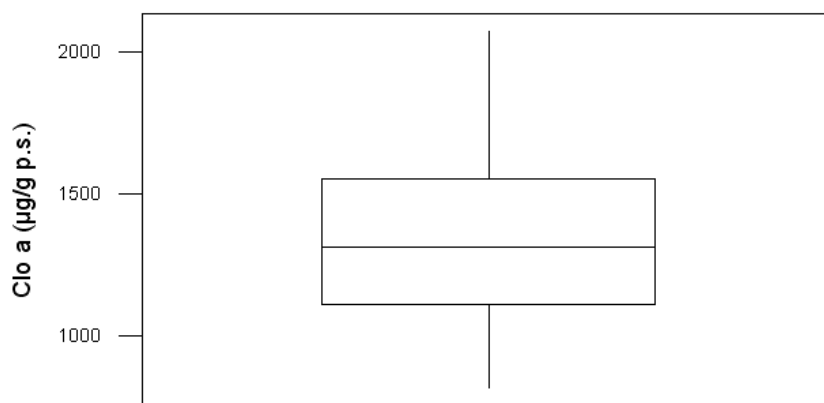


**BOXPLOTS RELATIVI AI VALORI DEI PARAMETRI ECOFISIOLOGICI MISURATI
NEI TALLI DEL TERZO TRAPIANTO (NOVEMBRE 2010- GENNAIO 2011)**



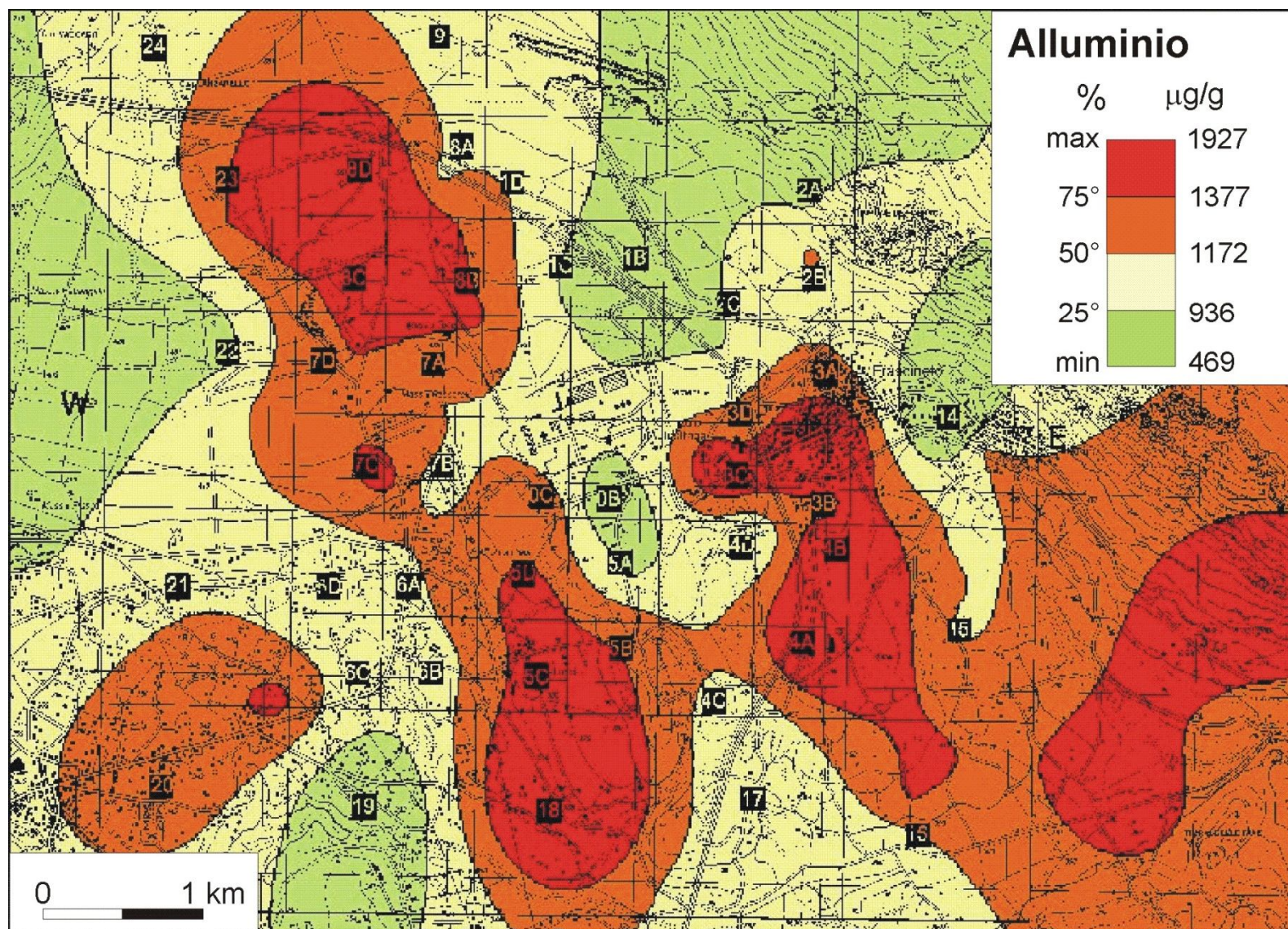


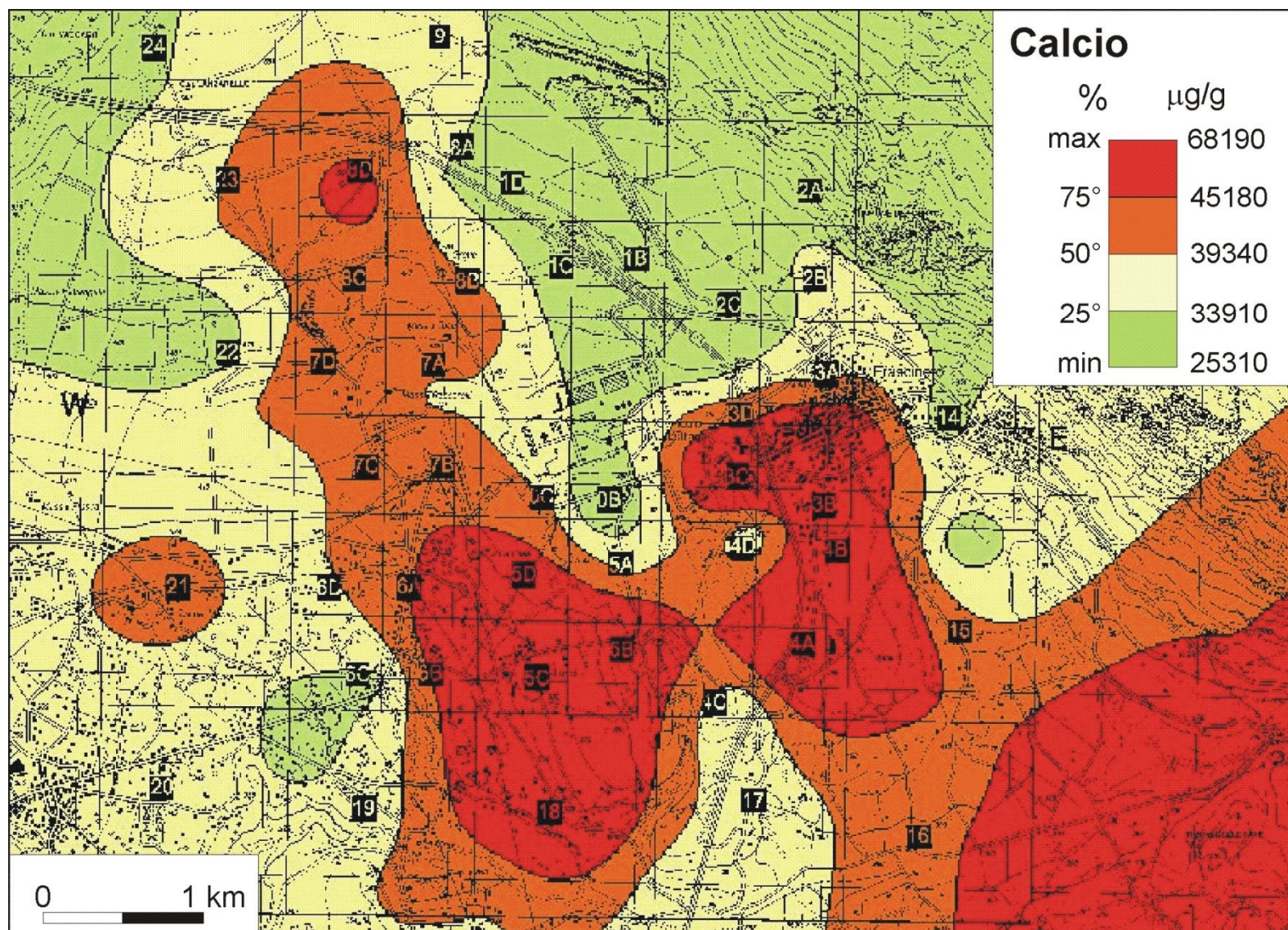
**BOXPLOTS RELATIVI AI VALORI DEI PARAMETRI ECOFISIOLOGICI MISURATI
NEI TALLI DEL QUARTO TRAPIANTO (FEBBRAIO 2011- APRILE 2011)**

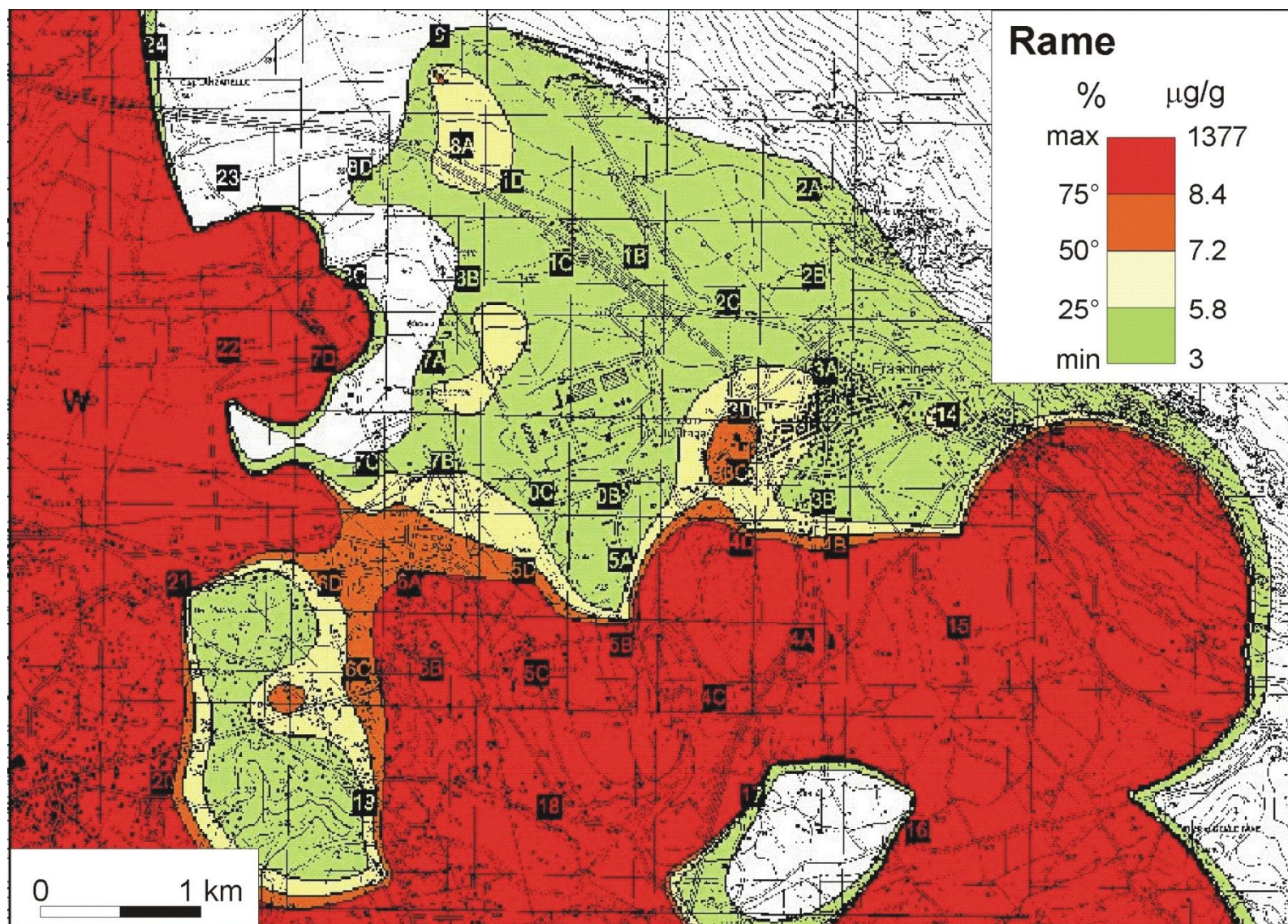


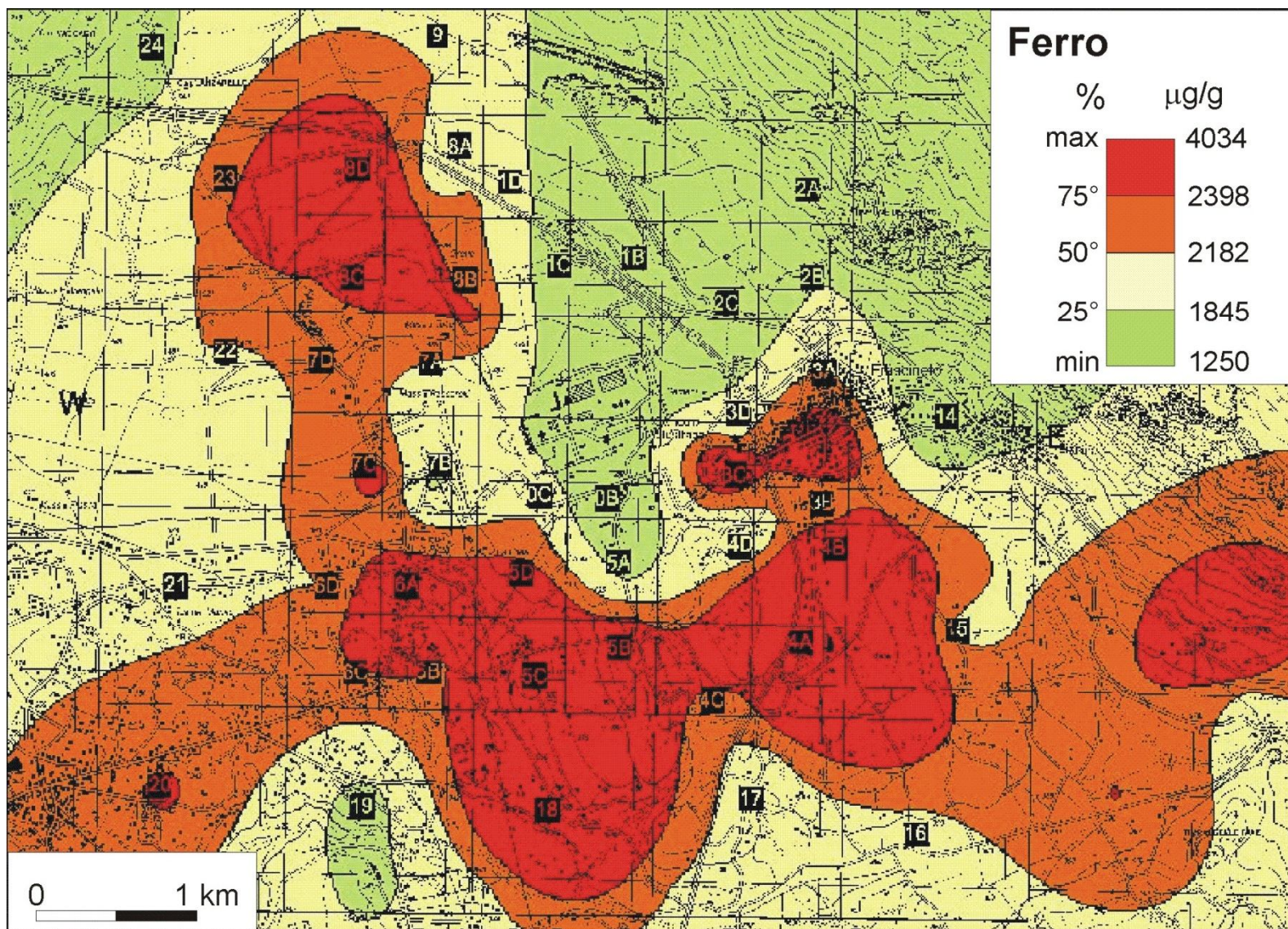
ALLEGATO II

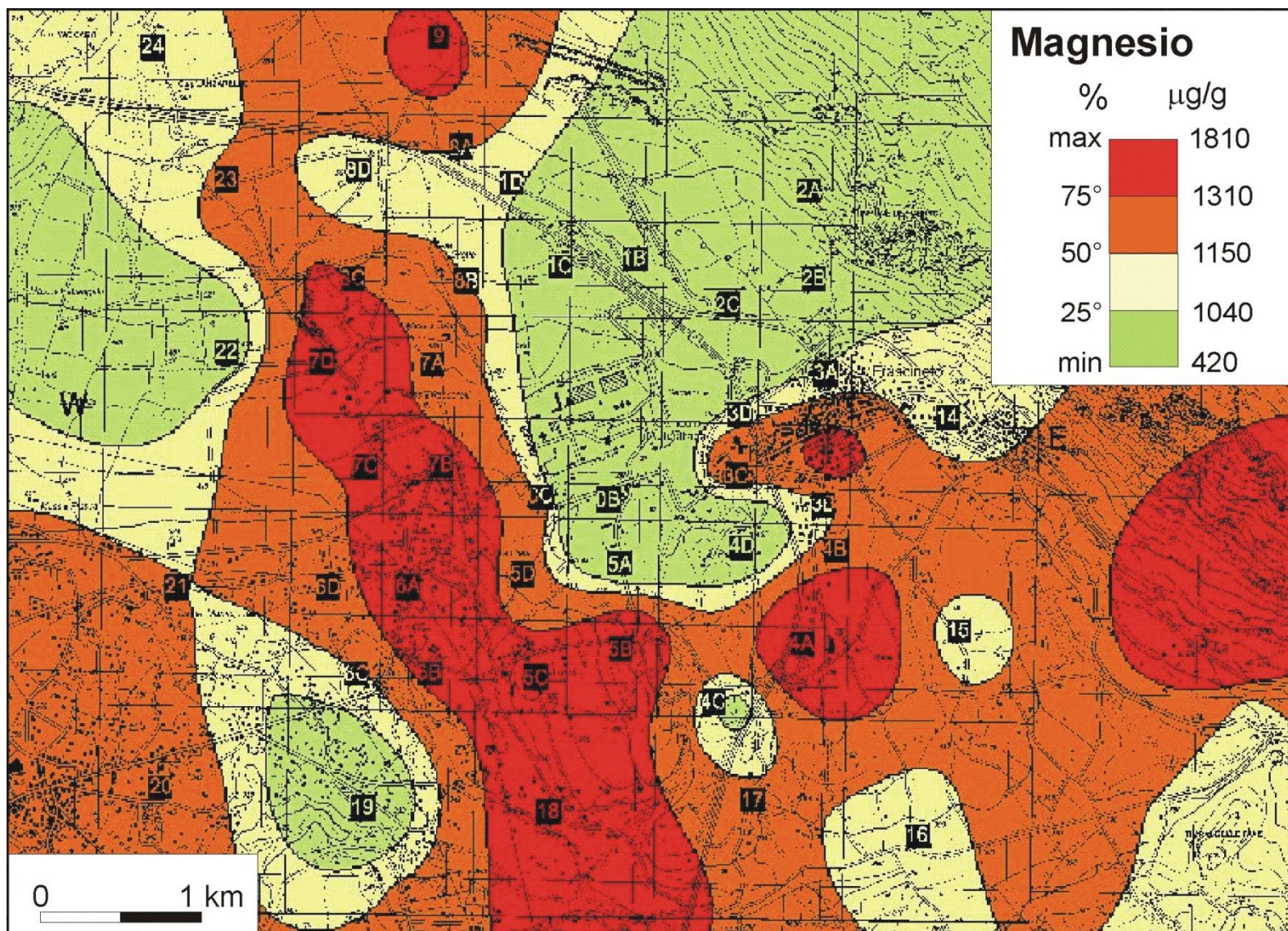
*Carte di isoconcentrazione relative ai metalli
bioaccumulati nel terzo trapianto lichenico*

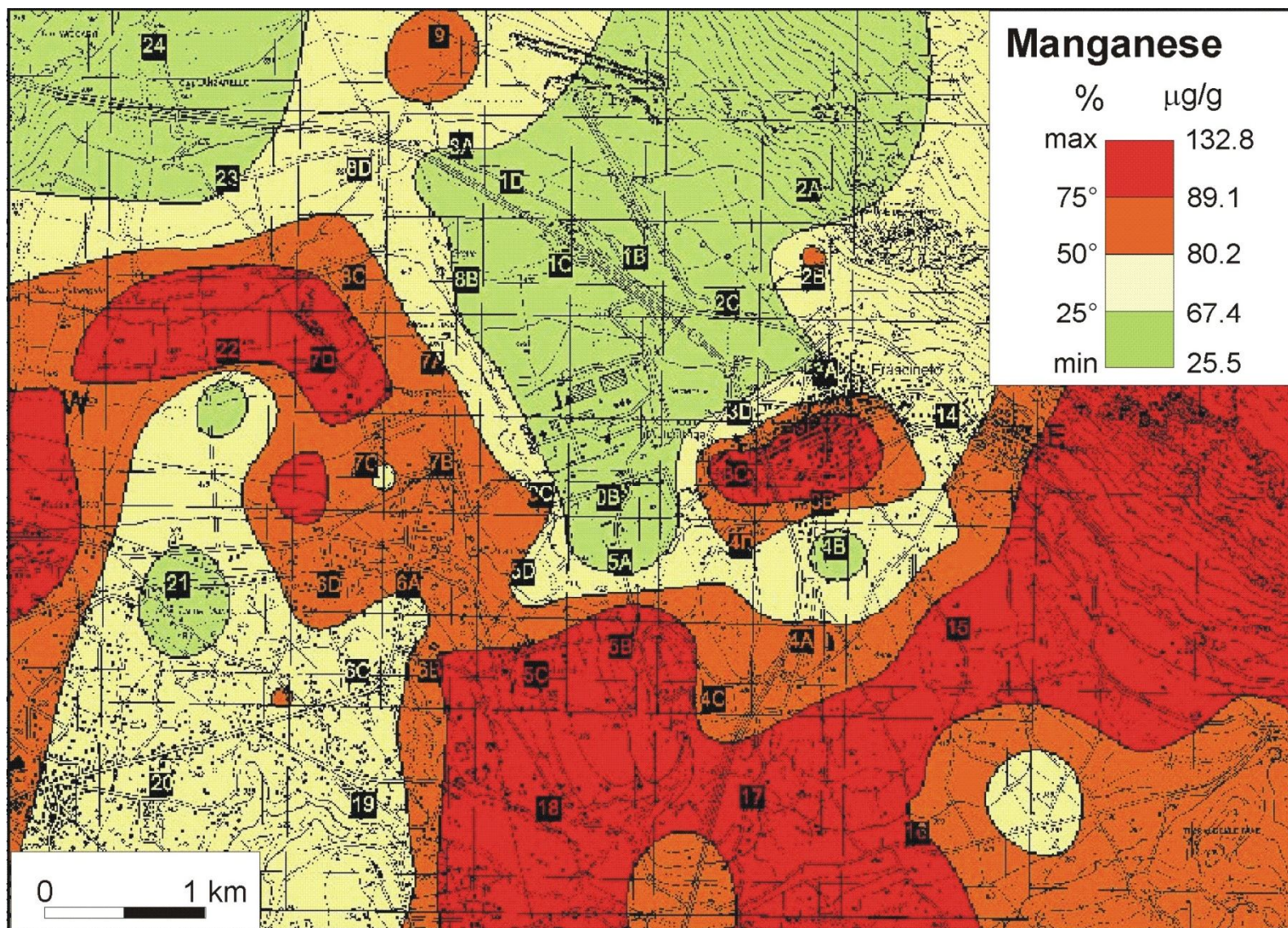


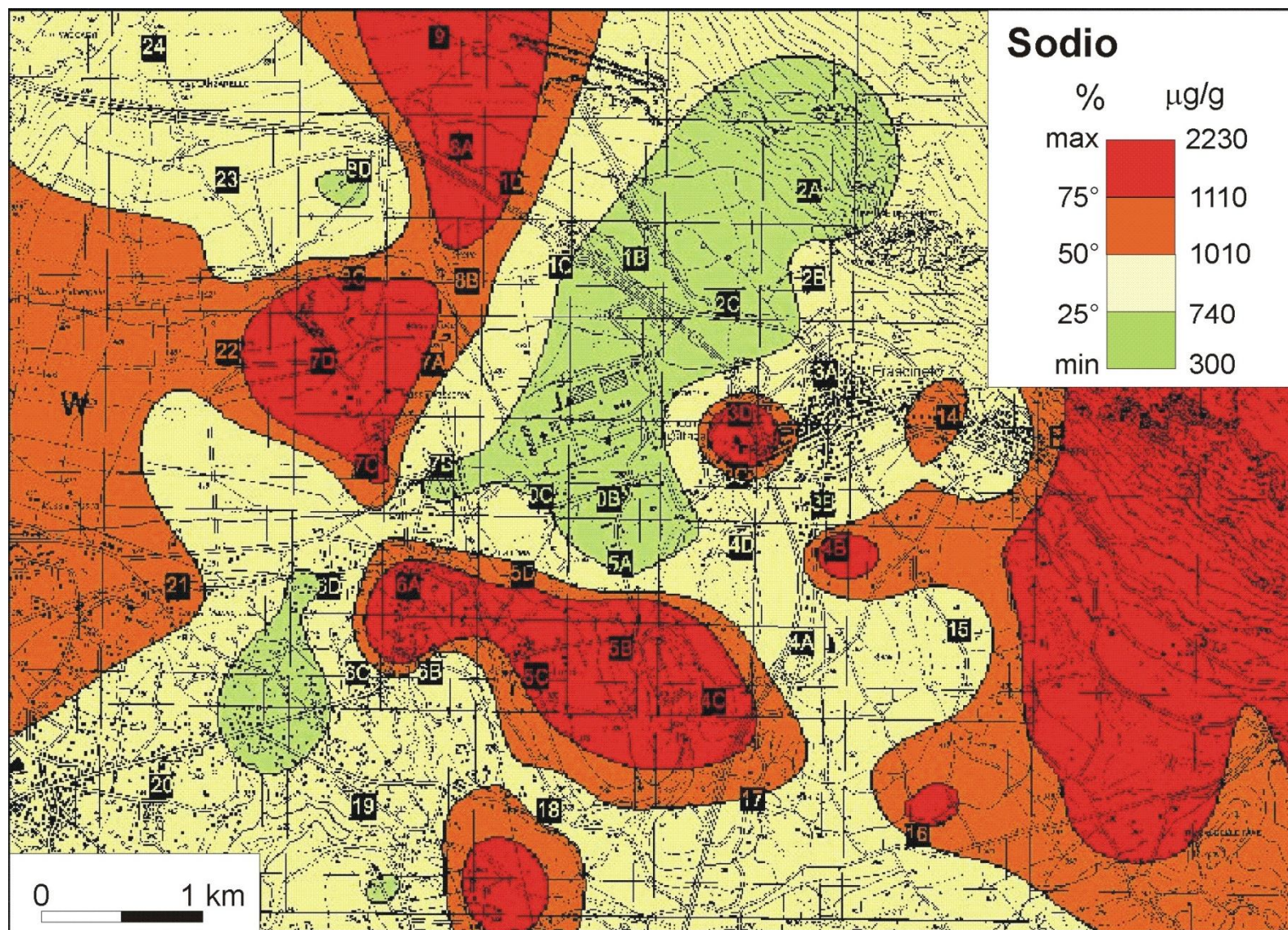


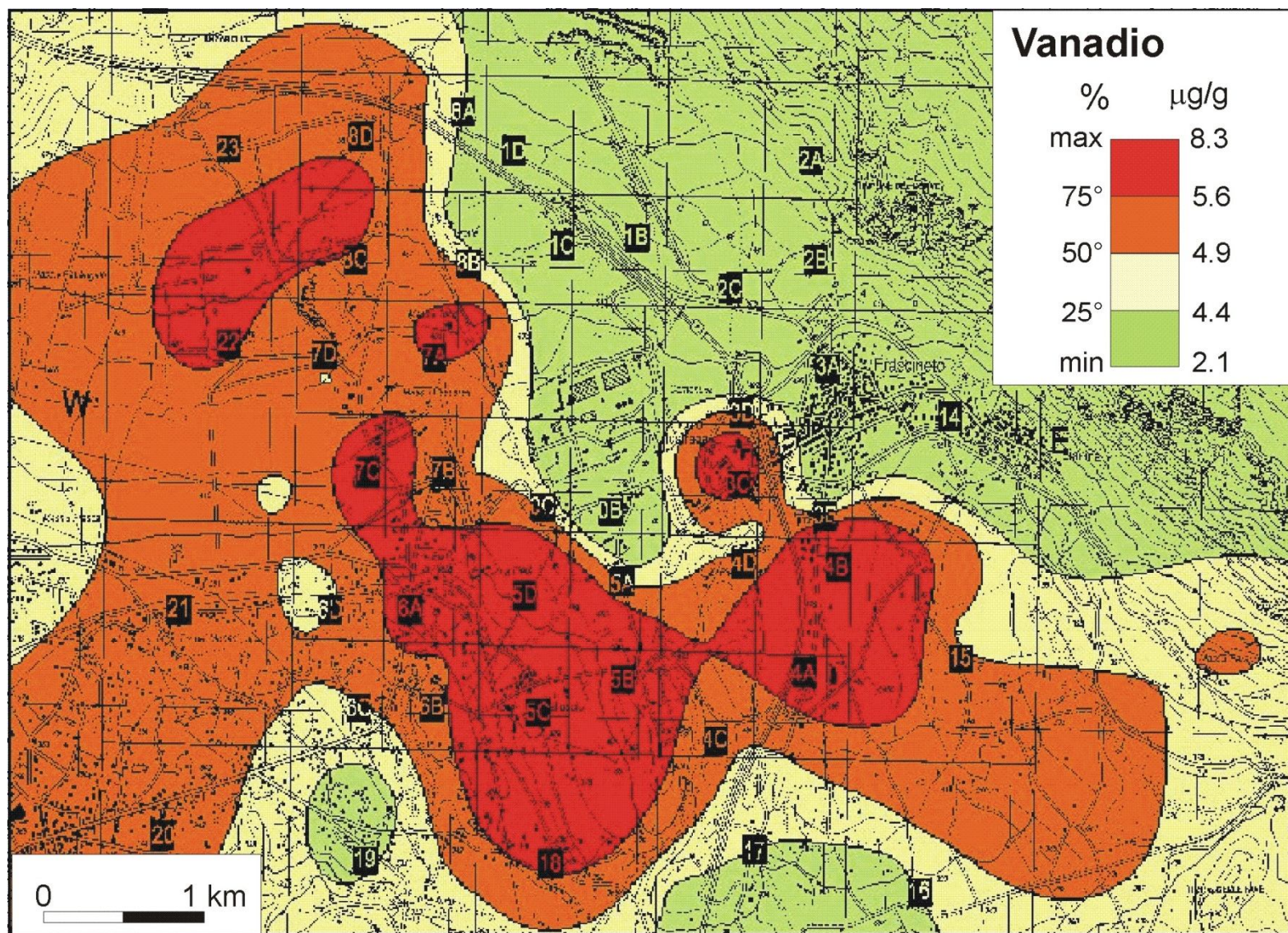






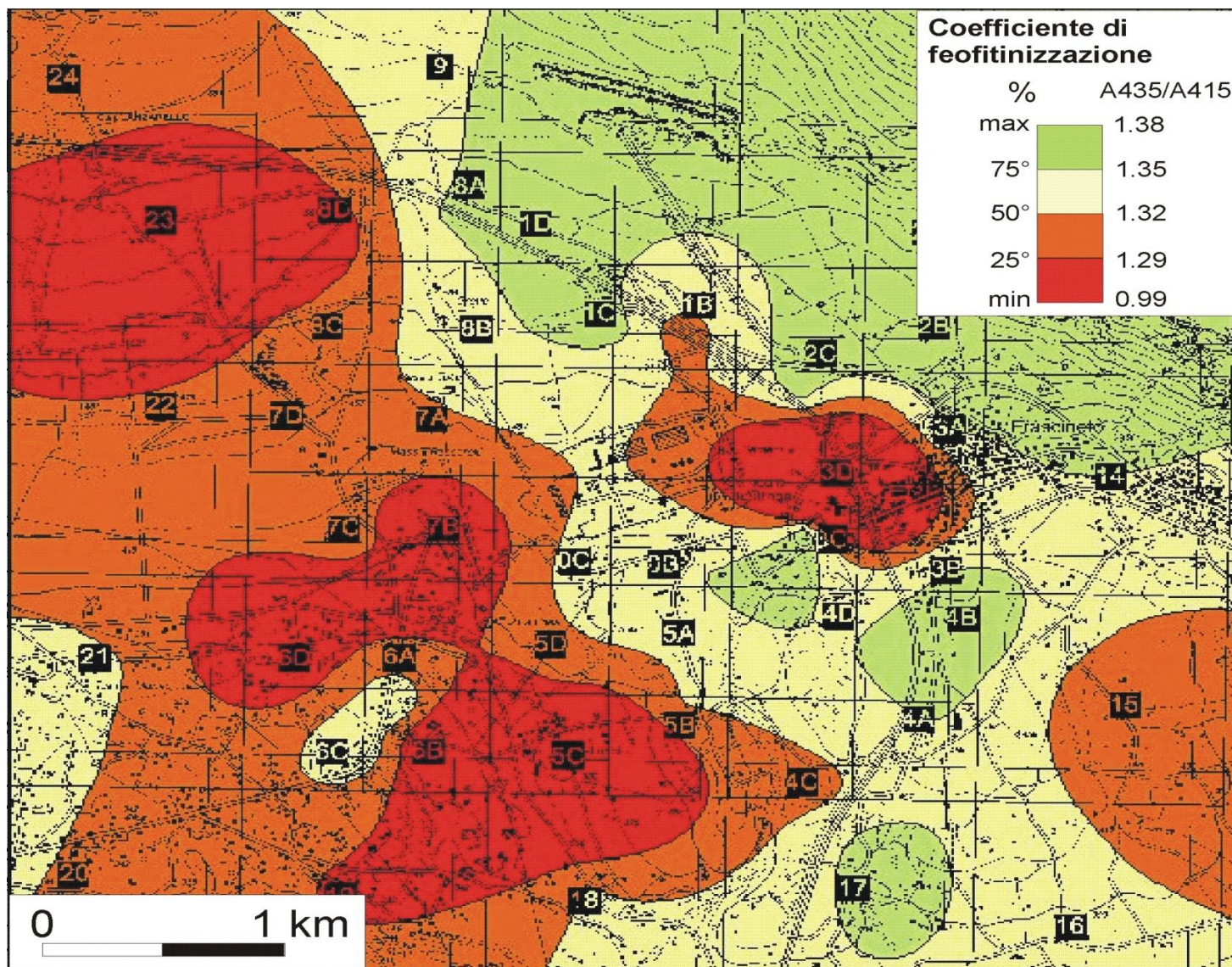


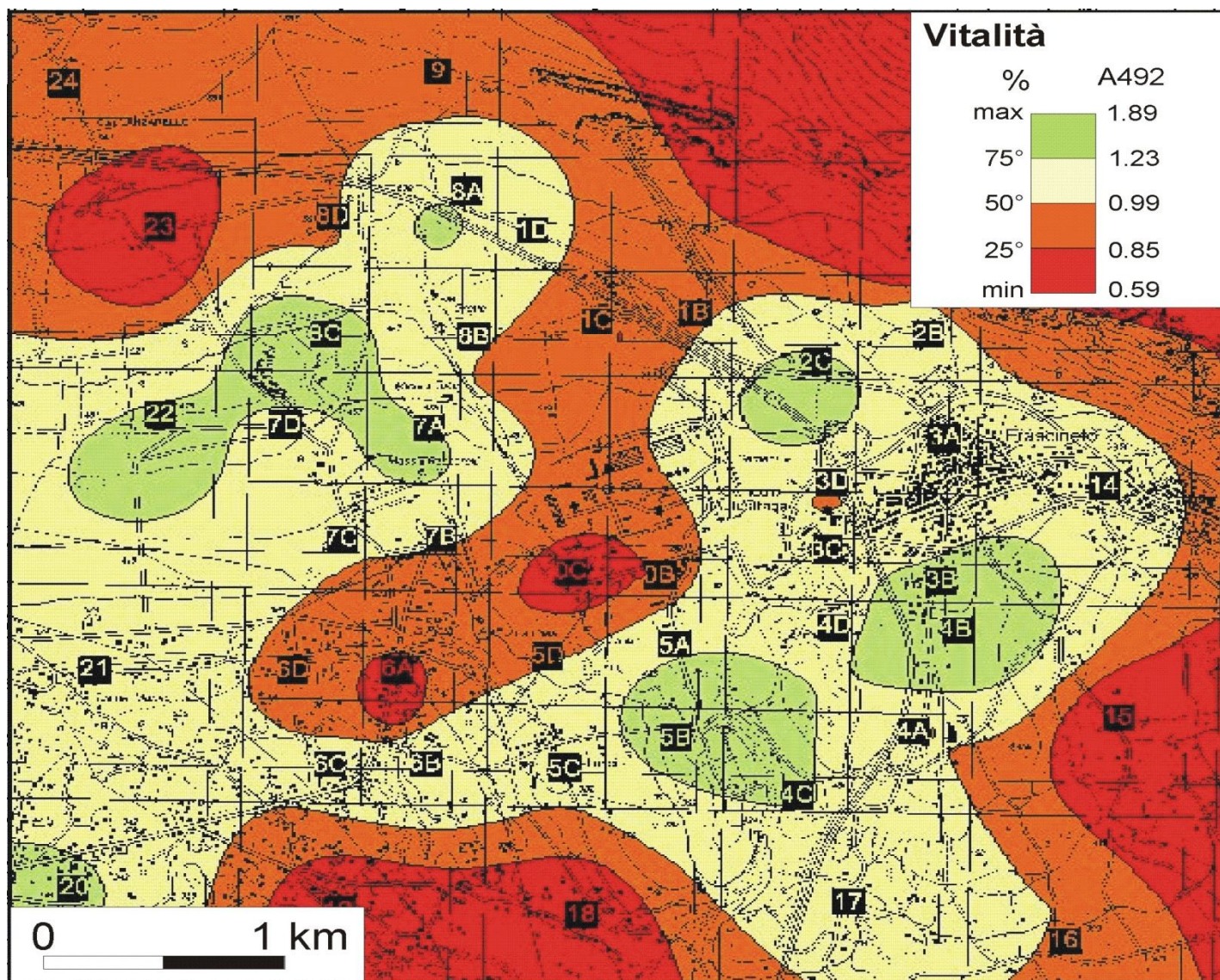


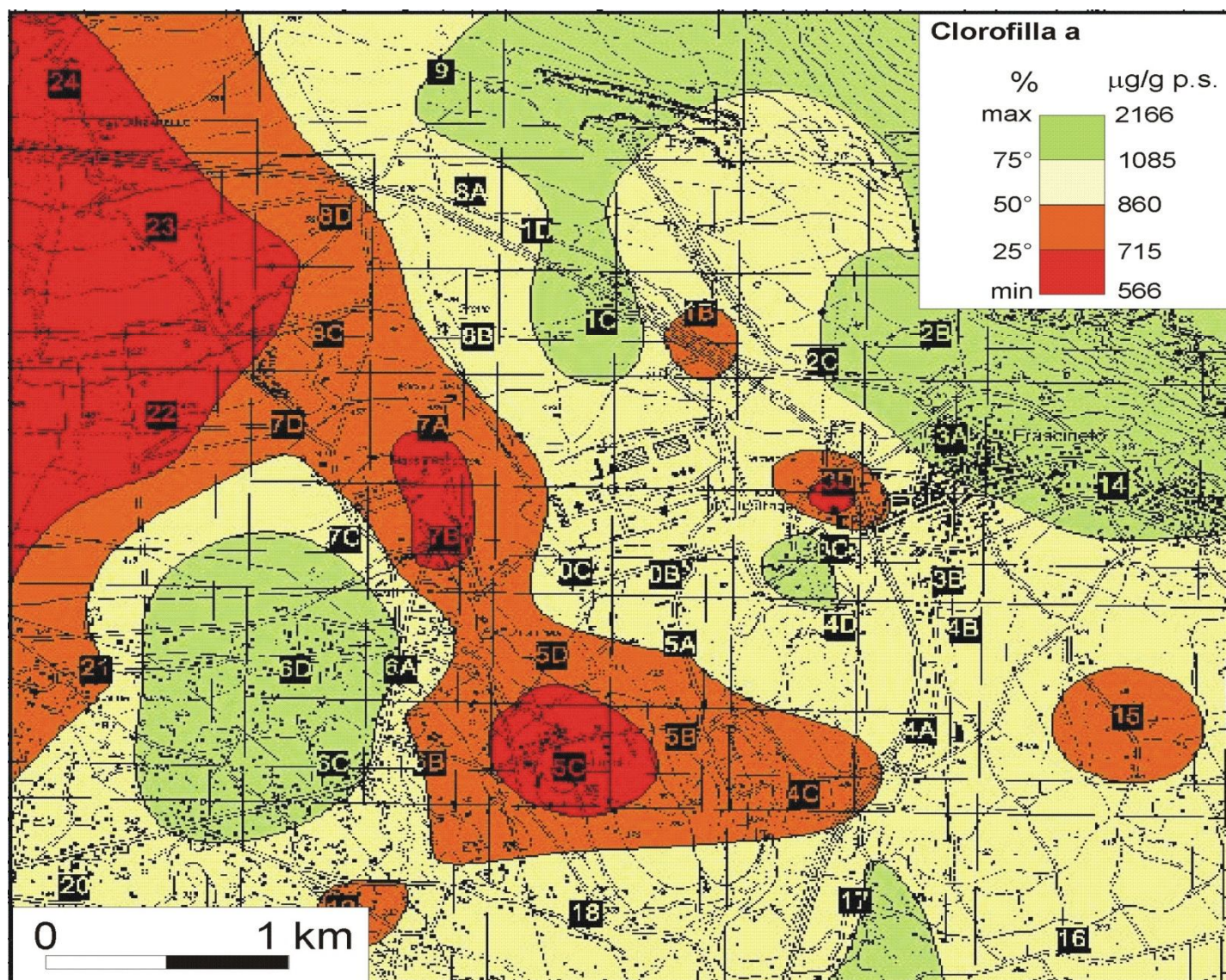


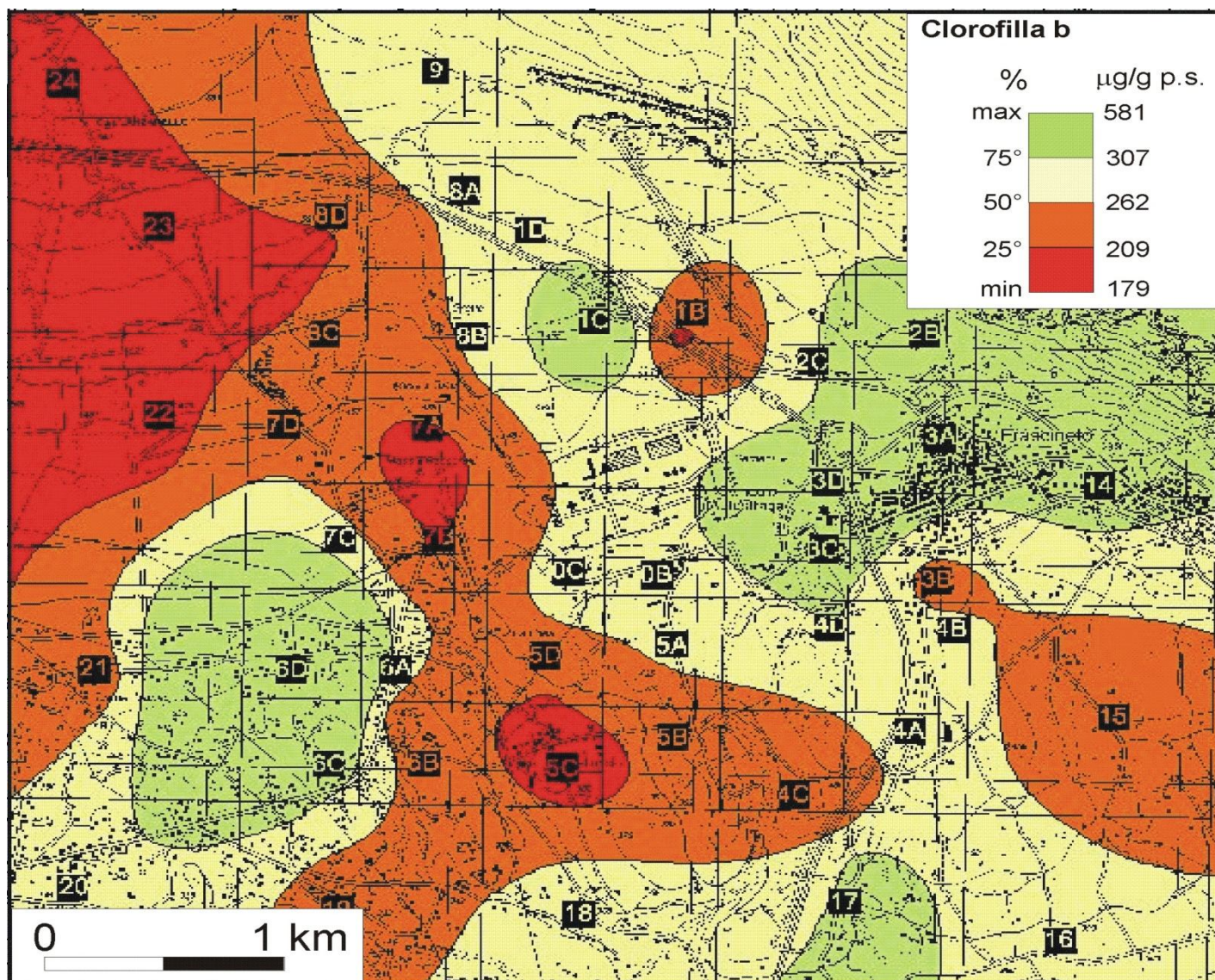
ALLEGATO III

*Carte di isoconcentrazione relative ai parametri ecofisiologici
misurati nei talli nei tre trapianti lichenici*

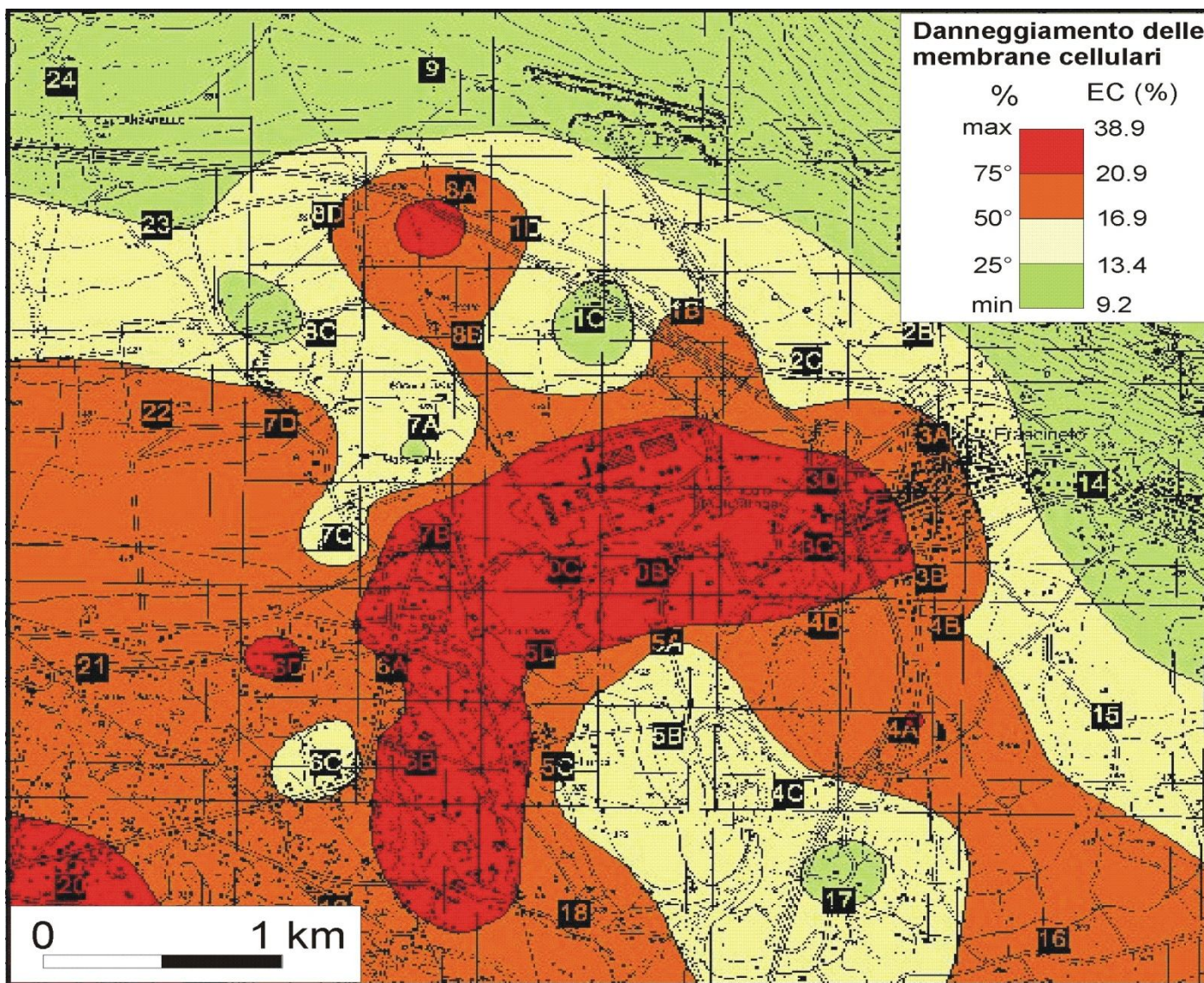


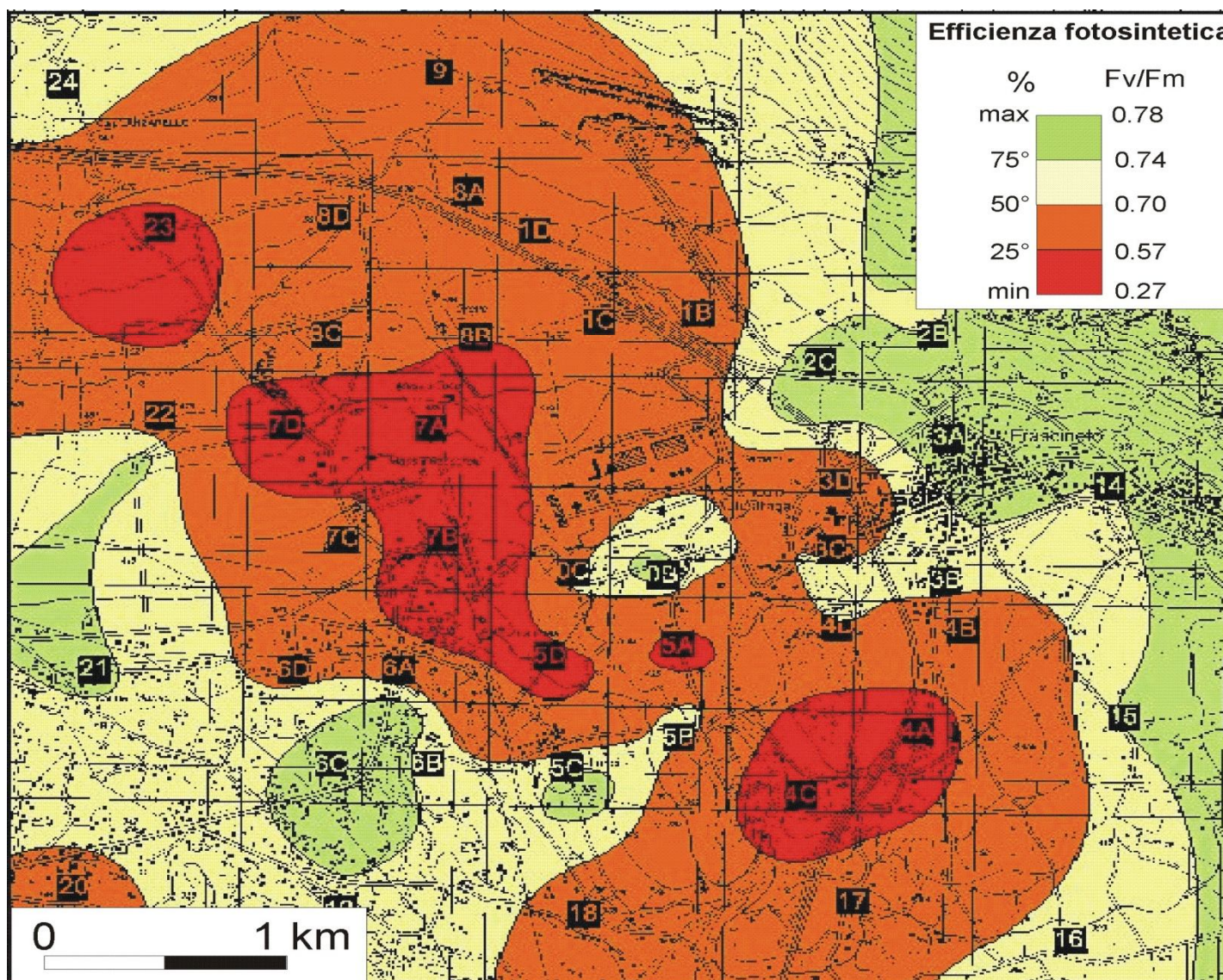


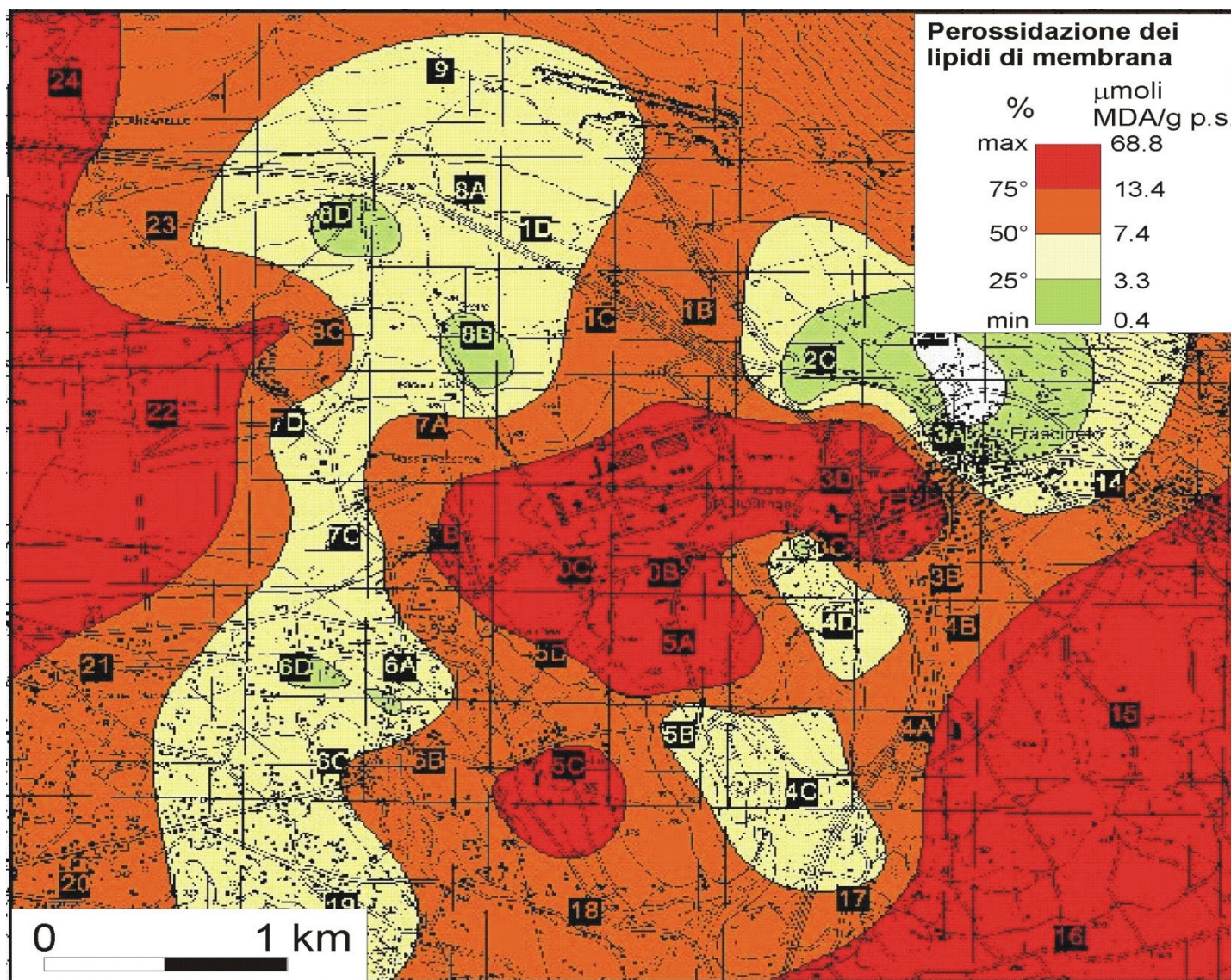


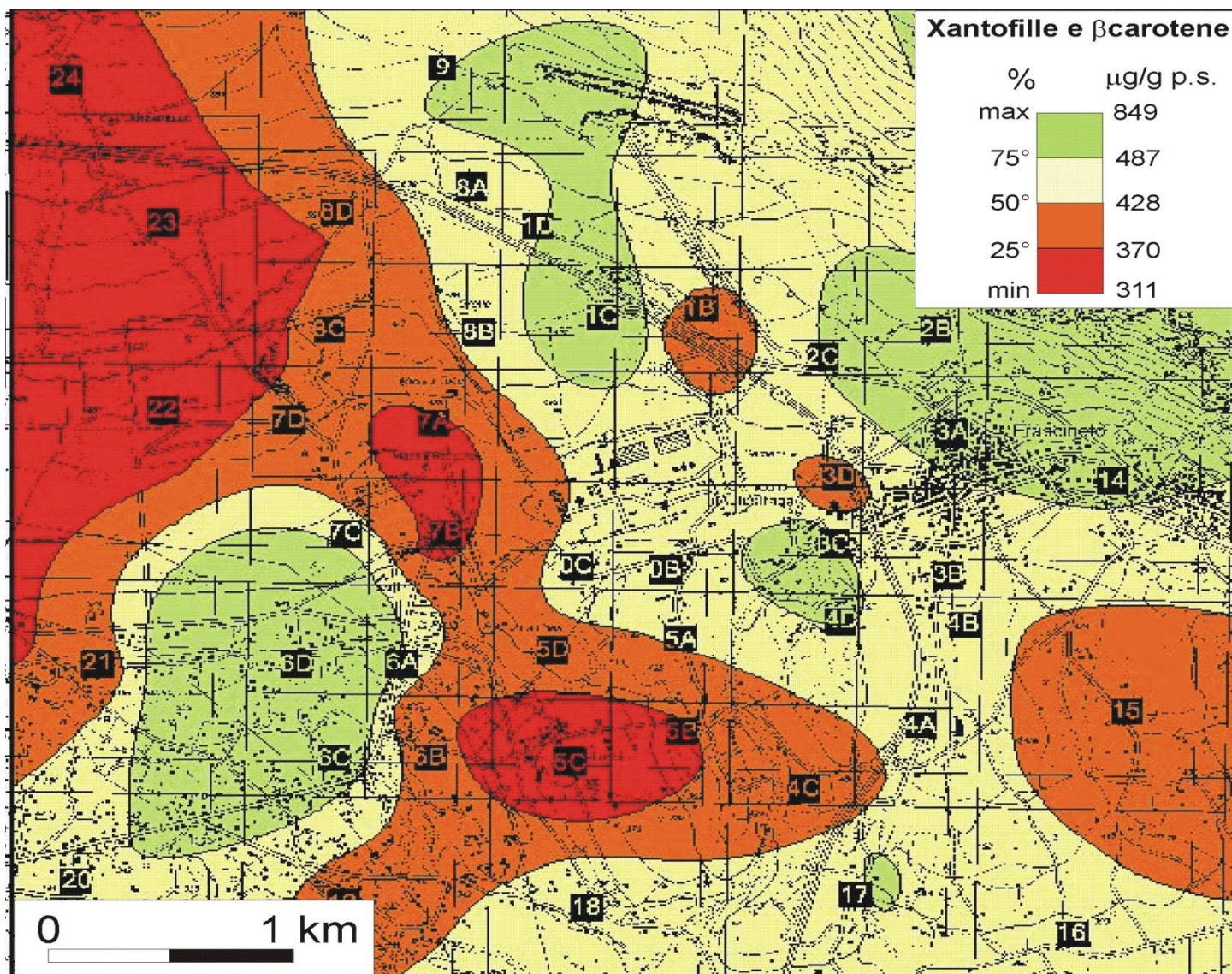


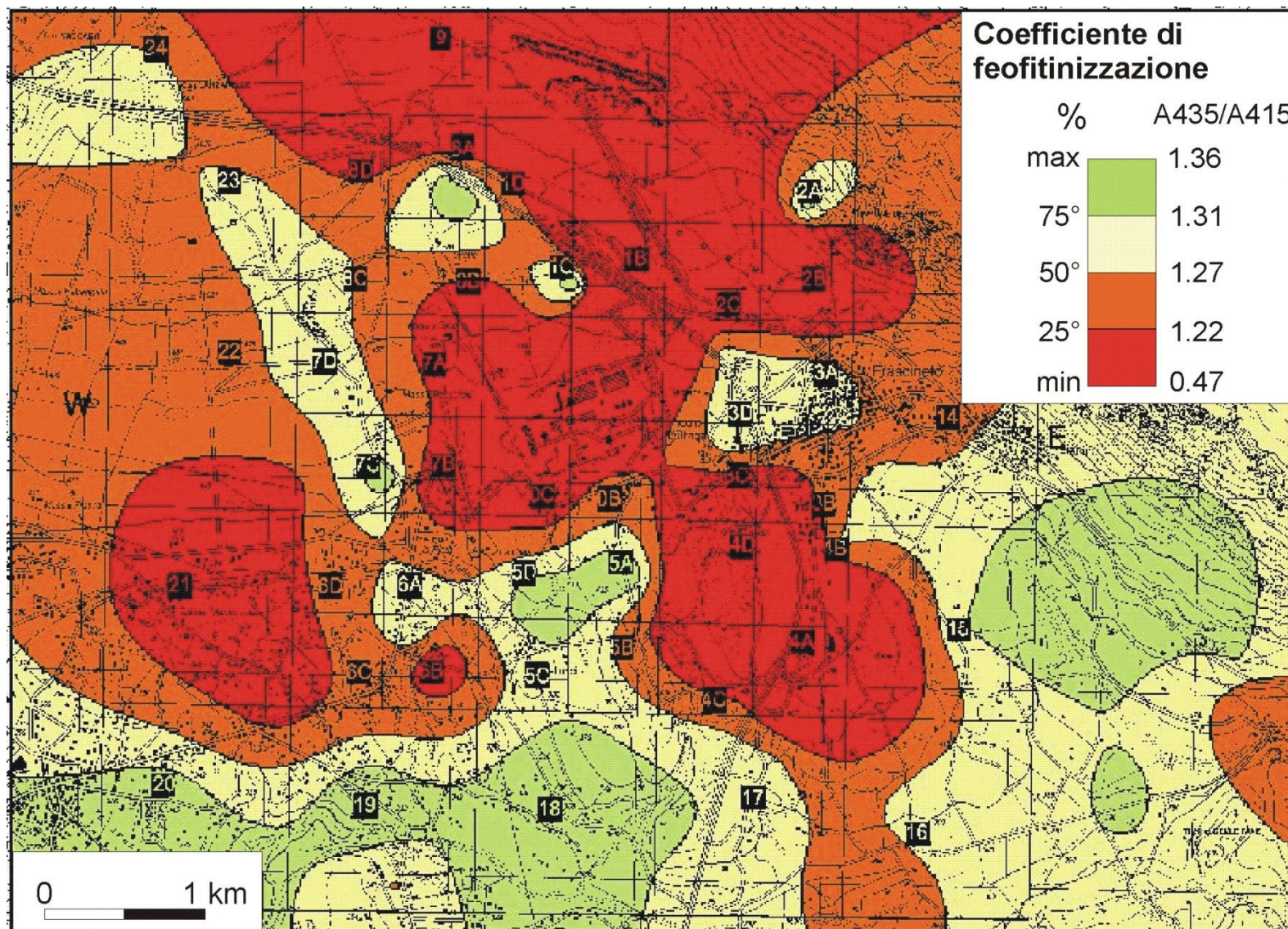
ALLEGATO III - PRIMO TRAPIANTO

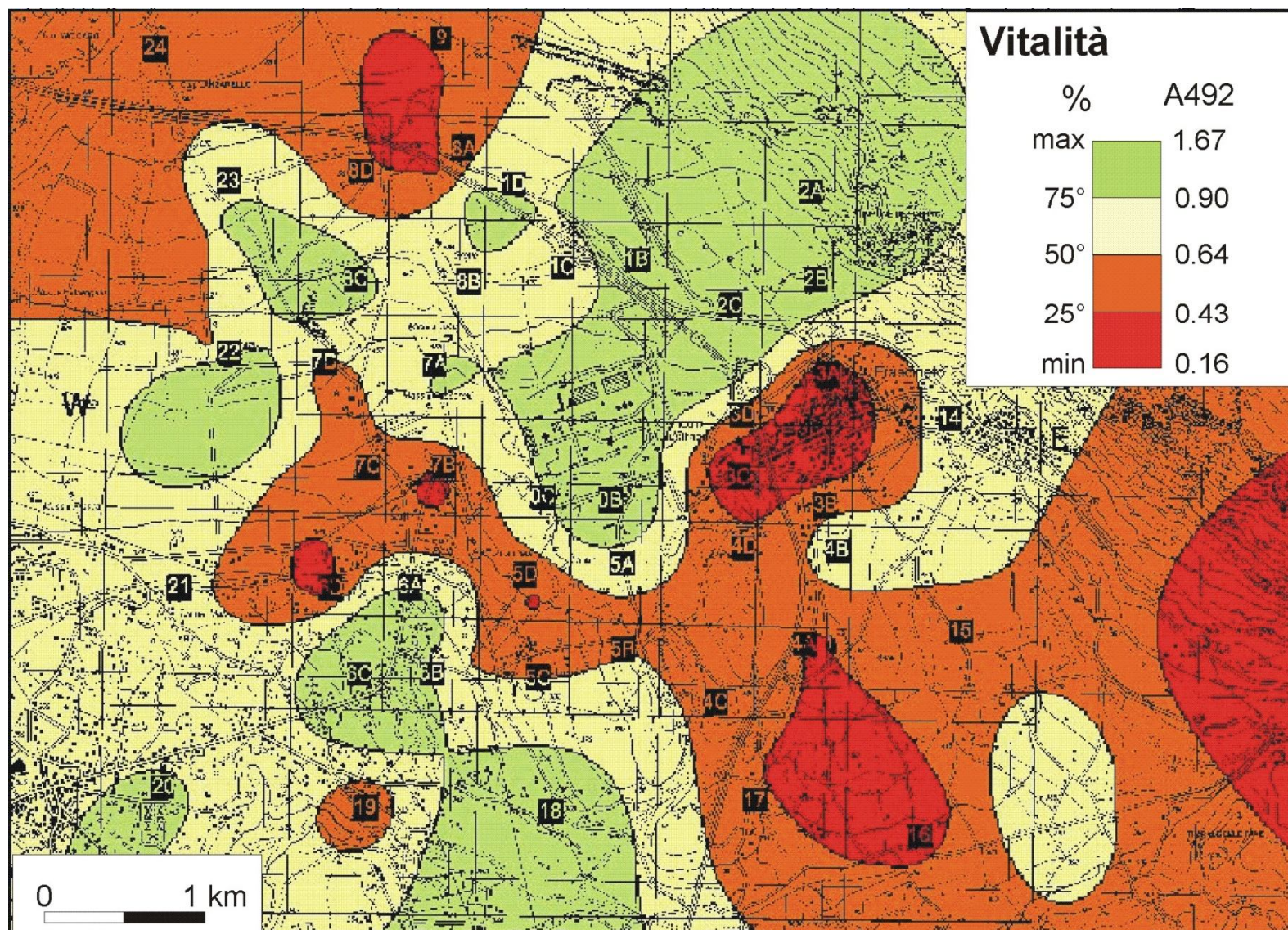












X

