



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente**

SzI Società
Lichenologica
Italiana

Linee guida per l'uso dei licheni come bioaccumulatori



MANUALI E LINEE GUIDA

Linee guida per l'uso dei licheni come bioaccumulatori

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale

Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma

www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 189/2019

ISBN 978-88-448-0966-9

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina: Sonia Poponessi

ISPRA – Area Comunicazione

Foto di copertina: Silvana Munzi

Società lichenologia Italiana (S.L.I.)

Coordinamento pubblicazione on line:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

Gennaio 2020

Autori

Questa linea guida è stata concepita e sviluppata dal Gruppo di Lavoro di Biomonitoraggio della Società Lichenologica Italiana (SLI).

Paolo Giordani (Università di Genova, coordinatore del Gruppo di Lavoro)

Renato Benesperi (Università di Firenze)

Elisabetta Bianchi (Università di Firenze)

Giorgio Brunialti (TerraData environmetrics)

Elva Cecconi (Università di Trieste)

Tania Contardo (Università di Siena)

Luca Di Nuzzo (Università di Firenze)

Lorenzo Fortuna (Università di Trieste)

Luisa Frati (TerraData environmetrics)

Stefano Loppi (Università di Siena)

Fabrizio Monaci (Università di Siena)

Silvana Munzi (Universidade de Lisboa)

Juri Nascimbene (Alma Mater Università di Bologna)

Luca Paoli (Università di Pisa)

Sonia Ravera (Università di Palermo)

Mauro Tretiach (Università di Trieste)

Andrea Vannini (Università di Siena)

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 Biomonitoraggio ambientale	7
1.2 Il biomonitoraggio nella legislazione italiana	7
1.3 Licheni come biomonitor di elementi aerodiffusi	8
1.4 Principi	9
2. ASPETTI IN COMUNE TRA IL METODO DEI LICHENI NATIVI E IL METODO DEI TRAPIANTI LICHENICI	10
2.1 Ambito e obiettivo.....	10
2.1.1 Condizioni di applicabilità.....	10
2.1.2 Obiettivo dello studio	10
2.1.3 Obiettivo del campionamento.....	10
2.2 Termini e definizioni.....	11
2.3 Materiale occorrente.....	12
2.3.1 Materiale necessario per la preparazione del lavoro di campo.....	12
2.3.2 Attrezzatura utile per il lavoro di campo	12
2.3.3 Materiale utile per le procedure di laboratorio	12
3. LINEE GUIDA PER IL BIOACCUMULO DI ELEMENTI MEDIANTE LICHENI NATIVI	14
3.1 Caratterizzazione dell'area studio	14
3.2 Disegno di campionamento	14
3.2.1 Unità di campionamento (UC)	14
3.2.2 Densità campionaria	14
3.2.3 Specie licheniche idonee.....	15
3.3 Attività in campo	15
3.3.1 Raccolta dei campioni	15
3.4 Preparazione dei campioni analitici.....	17
3.4.1 Selezione del materiale lichenico idoneo	17
3.4.2 Polverizzazione e omogeneizzazione dei campioni	17
3.4.3 Determinazione del peso secco	17
3.4.4 Conservazione dei campioni.....	18
3.5 Procedure analitiche	18
3.5.1 Analisi chimiche	18
3.5.2 Metodo di digestione	18
3.6 Espressione dei risultati.....	18
3.7 Interpretazione dei risultati.....	19
3.7.1 Analisi statistiche basilari per dati di biomonitoraggio.....	19
3.7.2 Strumento interpretativo: la scala di bioaccumulo per i licheni nativi.....	20
3.7.3 Attribuzione della classe di bioaccumulo all'Unità di Campionamento.....	20
4. LINEE GUIDA PER IL BIOACCUMULO DI ELEMENTI MEDIANTE TRAPIANTI LICHENICI	23
4.1 Esposizione dei licheni nell'area di studio: pianificazione	23

4.1.1	<i>Caratterizzazione dell'area di studio</i>	23
4.1.2	<i>Disegno di campionamento</i>	23
4.1.3	<i>Raccomandazioni per l'esposizione dei campioni nelle UC</i>	23
4.1.4	<i>Stima dello sforzo di campionamento nell'area di background</i>	24
4.1.5	<i>Durata dell'esposizione</i>	24
4.1.6	<i>Informazioni supplementari</i>	24
4.2	<i>Prelievo del materiale lichenico</i>	24
4.2.1	<i>Specie licheniche idonee</i>	24
4.2.2	<i>Caratterizzazione dell'area di background</i>	25
4.2.3	<i>Procedure per la raccolta dei licheni</i>	25
4.2.4	<i>Caratterizzazione morfometrica del materiale lichenico</i>	25
4.3	<i>Procedure di laboratorio</i>	26
4.3.1	<i>Preparazione del materiale lichenico</i>	26
4.3.2	<i>Preparazione dei campioni</i>	26
4.4	<i>Installazione e recupero dei campioni</i>	27
4.5	<i>Preparazione dei campioni analitici</i>	27
4.5.1	<i>Selezione del materiale lichenico idoneo</i>	27
4.5.2	<i>Polverizzazione e omogeneizzazione dei campioni</i>	27
4.5.3	<i>Determinazione del peso secco</i>	27
4.5.4	<i>Conservazione dei campioni</i>	28
4.6	<i>Procedure analitiche</i>	28
4.6.1	<i>Analisi chimiche</i>	28
4.6.2	<i>Metodo di digestione</i>	28
4.7	<i>Espressione dei risultati</i>	28
4.8	<i>Interpretazione dei risultati</i>	28
4.8.1	<i>Analisi statistiche basilari per dati di biomonitoraggio</i>	29
4.8.2	<i>Strumento interpretativo: la scala di bioaccumulo per i trapianti lichenici</i>	29
4.8.3	<i>Attribuzione della classe di bioaccumulo all'Unità di Campionamento</i>	29
5.	RACCOMANDAZIONI PER L'ASSICURAZIONE E IL CONTROLLO DI QUALITÀ	32
	ALLEGATO A. Diagramma di flusso delle fasi principali standard	34
	ALLEGATO B. Consigli per l'identificazione delle specie licheniche idonee	36
	ALLEGATO C. Esempi di trapianto ed espositori ^T	44
	ALLEGATO D. Esempi di schede informative	45
	ALLEGATO E. Informazioni necessarie alla fine della campagna di monitoraggio	48
	ALLEGATO F. Metodi di campionamento probabilistico	49
	ALLEGATO G. Valutazione preliminare della variabilità del contenuto elementare lichenico in un'area di background potenziale ^T	53
	ALLEGATO H. Procedure di mapping	58
	BIBLIOGRAFIA	60

1. INTRODUZIONE

1.1 Biomonitoraggio ambientale

Il monitoraggio ambientale attraverso gli organismi viventi (biomonitoraggio, vedere la definizione alla sezione 2.2) può essere molto efficace per rilevare i cambiamenti ambientali. Questo approccio si basa sul presupposto che qualsiasi cambiamento in atto nell'ambiente abbia un effetto significativo sul biota. La caratteristica chiave per l'utilizzo di indicatori biologici per monitorare lo stato dell'ambiente è quindi la loro capacità di riflettere chiaramente qualsiasi cambiamento nell'ambiente stesso (Keddy, 1991). Se questi presupposti sono soddisfatti, il biomonitoraggio è un metodo efficace per indagare l'impatto di fattori esterni sugli ecosistemi. Tra questi, l'inquinamento atmosferico svolge un ruolo importante poiché il suo impatto negativo sull'ambiente e sulla salute umana è sicuramente riconosciuto.

Il biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico ha una lunga storia, risalente alla seconda metà del 19° secolo, quando il botanico finlandese William Nylander (1866) osservò che i licheni epifiti a Parigi erano gravemente danneggiati dall'inquinamento atmosferico e ipotizzò che questi organismi potessero essere usati come bioindicatori della qualità dell'aria. È importante osservare che l'output degli studi di biomonitoraggio è diverso da quello ottenibile (i) mediante la modellazione della diffusione di inquinanti o (ii) dalle misure tramite dispositivi fisico-chimici attivi e passivi: mentre questi ultimi si riferiscono a dati sulle emissioni o concentrazioni ambientali di inquinanti, il biomonitoraggio valuta gli effetti biologici degli inquinanti (Markert et al., 2003). Sebbene l'uso di biomonitor sia solitamente raccomandato come complementare piuttosto che come alternativa al monitoraggio convenzionale mediante dispositivi strumentali o analisi di depositi di massa, in alcuni contesti il biomonitoraggio può fornire informazioni difficilmente ricavabili dal solo dato strumentale (p. es. il danno economico causato da una ridotta performance delle piante agricole esposte agli inquinanti difficilmente può essere previsto da qualsiasi dispositivo fisico-chimico; Loppi, 2014).

1.2 Il biomonitoraggio nella legislazione italiana

La direttiva 2008/99/CE del Parlamento e del Consiglio europeo stabilisce misure per la protezione dell'ambiente attraverso il diritto penale. In Italia questa Direttiva trova la sua prima applicazione con il Decreto Legislativo 121/2011 relativo alla protezione delle specie animali e vegetali in via di estinzione o minacciate, oltre ad alcuni habitat importanti. Tuttavia, è solo con la legge 68/2015 che la legislazione italiana ha introdotto nel codice penale una parte (titolo VI bis) specificamente dedicata ai reati contro l'ambiente, composta da dodici articoli, tra cui cinque nuovi articoli dedicati alla protezione dell'ambiente e dell'ecosistema. In questo contesto, è particolarmente rilevante l'articolo 452 bis intitolato "inquinamento ambientale": con questo articolo il legislatore ha specificato che sono punibili coloro che causano danni e deterioramenti significativi e misurabili di (i) acqua, aria o suolo, (ii) ecosistema, biodiversità, flora o fauna. Pertanto, mentre prima del 2015 l'ambiente è stato difeso solo al fine di preservare la sicurezza e la salute umana, con la legge 68/2015 l'ambiente in quanto tale ha acquisito per la prima volta in Italia il merito di essere protetto.

In Italia le tecniche di biomonitoraggio sono state ampiamente applicate per determinare la qualità dell'aria, del suolo e dell'acqua, come testimoniato da un enorme corpo di letteratura. Ciononostante, solo il biomonitoraggio della qualità delle acque interne è diventato obbligatorio per legge (dapprima con il decreto legislativo 152/1999, successivamente sostituito dal decreto legislativo 152/2006, dando attuazione alla direttiva 2000/60/CE che aveva stabilito un quadro generale nella politica del settore idrico). Per quanto riguarda la qualità dell'aria, l'Italia ha attuato la direttiva 2008/50/CE sulla qualità dell'aria, ambiente e per un'aria più pulita in Europa con il decreto legislativo 155/2010, che, per la valutazione della qualità dell'aria, si riferisce specificatamente all'uso di bioindicatori per la valutazione degli effetti sugli ecosistemi causati da arsenico, cadmio, nichel, mercurio e idrocarburi policiclici aromatici (articolo 5, paragrafo 12). Purtroppo, dopo nove anni mancano ancora le misure applicative di tale decreto.

Il monitoraggio ambientale è fondamentale per la valutazione dell'impatto ambientale (VIA) poiché consente di verificare l'impatto di qualsiasi lavoro/azione sull'ambiente attraverso il monitoraggio di parametri fisici, chimici e biologici. L'obiettivo principale di qualsiasi VIA è la caratterizzazione delle condizioni ambientali di base prima del lavoro/azione ("ante operam") e la valutazione delle modifiche dopo che il lavoro/l'azione è stata eseguita e messa in funzione ("post operam"). Per raggiungere questo obiettivo è necessario un piano di monitoraggio ambientale (EMP), che deve specificare i

parametri/gli indicatori da indagare, l'approccio metodologico, il numero e la posizione dei siti di campionamento (MATTM, 2014). In dettaglio, per ogni parametro/indicatore, l'EMP deve specificare il valore accettabile di regolamentazione (RAV), che a sua volta determina se un valore ambientale previsto o misurato è accettabile o meno. Mancando un RAV, i criteri e i metodi per la definizione di un valore rilevante dal punto di vista ambientale (ERV) devono essere dettagliati poiché questi ultimi possono influenzare notevolmente i risultati; inoltre, per evitare di dare la falsa impressione che i risultati siano basati su un valore di soglia ben definito, è necessario definire l'intervallo di variabilità "naturale" dell'ERV (MATTM, 2014). Quest'ultimo è il caso del monitoraggio biologico della qualità dell'aria.

1.3 Licheni come biomonitor di elementi aerodiffusi

Il monitoraggio biologico si è dimostrato molto utile nella valutazione dell'inquinamento atmosferico da elementi in traccia (Manning & Feder, 1980): in particolare, l'uso di licheni per la valutazione dei livelli atmosferici e dei pattern di deposizione di elementi in traccia è ben consolidato (Bačkor e Loppi, 2009). I tentativi di correlare gli elementi accumulati dai licheni con le concentrazioni atmosferiche hanno suggerito che i licheni riflettono principalmente deposizioni secche e umide (Pilegaard, 1979; Sloof, 1995; Godihno et al., 2008; Loppi & Paoli, 2015). Tuttavia, alcuni studi hanno indicato che i licheni accumulano preferenzialmente elementi contenuti nel particolato (Glenn et al., 1991; Bari et al., 2001; Costa et al., 2002). Di conseguenza, i licheni sono sempre più utilizzati come uno strumento importante nel contenzioso legale ambientale (Tretiach et al., 2011; Purvis et al., 2013; Contardo et al., 2019).

Recentemente, per diversi motivi l'uso di trapianti di licheni è stato generalmente preferito rispetto all'uso di licheni nativi (vedere le definizioni nella sezione 2.2). Innanzitutto, nel caso dei trapianti, il piano di campionamento può essere impostato e realizzato correttamente senza i vincoli di trovare alberi adatti colonizzati da licheni e, soprattutto, di trovare campioni di licheni autoctoni, possibilmente della stessa specie in tutti i siti di monitoraggio, in aree fortemente inquinate, dove i licheni possono essere molto rari o addirittura assenti ("deserto lichenico"). In secondo luogo, nel caso dei trapianti il tempo di esposizione del lichene è noto e non è necessario utilizzare stime di crescita annuale per determinare il tempo in cui il materiale è stato esposto a potenziali deposizioni inquinanti (Fortuna & Tretiach, 2018). In terzo luogo, l'interpretazione dei risultati di esposizioni di trapianti può essere basata sulla conoscenza dei valori di concentrazione misurati in campioni esposti e non esposti (sezione 2.2). Esprimere i risultati come EU ratio (Exposed-to-Unexposed ratio) consente confronti spaziali e temporali, indipendentemente dalle differenze nelle concentrazioni iniziali di campioni non esposti (Fрати et al., 2005; Cecconi et al., 2019a; Loppi et al., 2019). Inoltre, consente di indagare la capacità di accumulo di diverse specie nelle stesse condizioni (Bergamaschi et al., 2007). Per contro, il limite del metodo dei trapianti è che non può essere utilizzato in caso di rilevazioni impreviste, ad esempio in caso di incidente rilevante in un impianto industriale. In quest'ultimo caso l'uso di licheni nativi può rivelarsi molto utile per soddisfare i requisiti delle cosiddette direttive Seveso (82/501/CE, 96/82/CE, 2012/18/UE).

Nonostante l'enorme letteratura sull'uso dei licheni nativi e trapiantati come bioaccumulatori di elementi principali e in traccia, esiste una considerevole serie di diverse procedure disponibili per quasi tutte le fasi coinvolte, dalla strategia di campionamento all'elaborazione dei campioni, all'analisi chimica, all'interpretazione dei dati e controllo di qualità. Tale mancanza di coerenza spesso impedisce ogni possibilità di confrontare diversi studi e influisce notevolmente sulla qualità dei dati. Questo documento contiene linee guida e suggerimenti pratici per svolgere correttamente ogni fase di un'indagine di biomonitoraggio di elementi principali e in traccia mediante l'uso di licheni. In particolare, queste linee guida forniscono due metodi standard per gli studi di bioaccumulo basati, rispettivamente, sui licheni nativi e trapiantati. Un'enfasi speciale è data al punto cruciale dell'interpretazione dei risultati, che ha notoriamente importanti risvolti nell'ambito del processo decisionale e del contenzioso legale ambientale. Questo problema, affrontato estensivamente nel contesto del biomonitoraggio umano e della valutazione del rischio chimico (p. es., Hays et al., 2007; Clewell et al., 2008) è stato affrontato anche nel campo del biomonitoraggio lichenico, con lo sviluppo di diversi strumenti interpretativi per licheni nativi e trapiantati. Qui, pur seguendo approcci di base già utilizzati in precedenti scale interpretative (Nimis & Bargagli, 1999; Frати et al., 2005), vengono adottate nuove "scale di bioaccumulo indipendenti dalle specie" per i licheni nativi e trapiantati. Le nuove scale superano la maggior parte delle criticità riscontrate nei precedenti strumenti interpretativi, poiché si basano sul concetto che l'inquinamento può essere quantificato da rapporti adimensionali tra valori sperimentali e di riferimento (Cecconi et al., 2019a).

1.4 Principi

Le procedure descritte in queste linee guida sono applicabili per la raccolta di dati di bioaccumulo di macro-elementi ed elementi in traccia nei licheni mediante due metodi: il metodo dei licheni nativi e quello dei trapianti lichenici. Al fine di garantire la qualità dei dati, le campagne di biomonitoraggio che applicano queste linee guida devono essere condotte da personale e istituzioni che siano in possesso delle necessarie competenze nel riconoscimento delle specie biomonitor adatte (Allegato B), nella preparazione di materiale biologico per la determinazione analitica e nella pianificazione di disegni di campionamento probabilistico (par. 2.2, Allegato F).

2. ASPETTI IN COMUNE TRA IL METODO DEI LICHENI NATIVI E IL METODO DEI TRAPIANTI LICHENICI

I seguenti paragrafi descrivono gli aspetti in comune ai due metodi. I paragrafi sono contrassegnati con l'apice *N* o *T* quando i contenuti si riferiscono rispettivamente a materiali e metodologie idonei esclusivamente per i licheni nativi ^N o per i trapianti lichenici ^T.

2.1 Ambito e obiettivo

Queste linee guida sono basate sulla revisione delle migliori pratiche e dei risultati di recenti studi metodologici e applicativi. Esse riguardano l'utilizzo di licheni epifiti (bioaccumulo mediante licheni nativi e mediante trapianti di licheni) per monitorare gli andamenti spaziali e temporali delle concentrazioni di elementi (macro-elementi ed elementi in traccia) legati alle deposizioni atmosferiche. Nel documento sono affrontate separatamente tutte le fasi di uno studio di biomonitoraggio. Inoltre, viene fornito un quadro di suggerimenti e dettagli pratici relativi alle attrezzature e ai protocolli per la raccolta, la preparazione, l'esposizione e il recupero dei campioni di licheni, nonché le buone pratiche per l'elaborazione, l'espressione e l'interpretazione dei risultati.

Nota. Per quanto riguarda i trapianti di licheni, queste linee guida non includono indicazioni sulla cosiddetta tecnica dei '*lichen bags*' (cioè studi basati su trapianti in cui porzioni selezionate di materiale lichenico sono esposte all'aria all'interno di sacchetti di rete di nylon; cfr. Adamo et al., 2003), dal momento che questo metodo è stato originariamente messo a punto per i muschi e che l'esposizione di talli lichenici interi può essere eseguita più facilmente (par. 4.3.2).

2.1.1 Condizioni di applicabilità

Il metodo dei licheni nativi è applicabile in aree dove le specie licheniche adatte sono presenti con una distribuzione spaziale omogenea e in quantità sufficiente in ogni unità di campionamento (par. 2.2, cfr. Capitolo 3).

Il metodo dei trapianti di licheni è applicabile nelle stesse condizioni del metodo dei licheni nativi, ma anche in aree (i) prive di licheni nativi (ad esempio all'interno del cosiddetto "deserto lichenico"), (ii) con una distribuzione irregolare di specie adatte, o (iii) con una quantità di campioni insufficiente per le analisi chimiche (cfr. Capitolo 4).

2.1.2 Obiettivo dello studio

Sulla base dell'intervallo temporale di riferimento, gli studi possono essere classificati in:

- i. Studi di biomonitoraggio mirati a quantificare per la prima volta le concentrazioni di macro-elementi ed elementi in traccia nei talli lichenici (studi di riferimento) all'interno di un'area di studio (par. 2.2).
- ii. Programmi di biomonitoraggio basati su una serie di misurazioni ripetute nel tempo nella stessa area di studio. In questo caso, l'obiettivo è il rilevamento delle variazioni delle concentrazioni di macro-elementi e di elementi in traccia nel tempo. Le indagini di biomonitoraggio condotte per confrontare gli effetti delle emissioni inquinanti riferite a scenari ante- e post-operam sono un esempio di questo approccio.

2.1.3 Obiettivo del campionamento

Per il metodo dei licheni nativi, l'obiettivo del campionamento è ottenere una misura delle concentrazioni di macro-elementi ed elementi in traccia in campioni di licheni nativi raccolti nell'area di studio.

Per il metodo dei trapianti lichenici, l'obiettivo del campionamento è valutare l'entità dell'arricchimento di macro-elementi ed elementi in traccia in campioni di licheni trapiantati nell'area di studio (ovvero i valori di concentrazione misurati nei campioni esposti, par. 2.2) rispetto ai campioni non trapiantati (ovvero i valori di concentrazione misurati nei campioni non esposti, par. 2.2).

2.2 Termini e definizioni

Per gli scopi di questo documento si applicano i seguenti termini e definizioni.

- **Albero standard**^N. Albero colonizzato da talli lichenici della specie selezionata al di sopra dei 100 cm dal suolo.
- **Area di background**^T. Un'area remota, ad estensione limitata ed ecologicamente omogenea, lontana da sorgenti puntiformi e diffuse di inquinamento, in cui vengono raccolti i talli lichenici da trapiantare.
- **Area di studio**. L'area di interesse per lo studio di biomonitoraggio. Deve essere definita dettagliatamente in termini di configurazione geografica, estensione, uso del suolo, antropizzazione e topografia.
- **Aree non campionabili**. Aree temporaneamente o permanentemente inaccessibili (p. es. aree private per cui l'accesso è stato temporaneamente/permanentemente negato, aree caratterizzate da barriere fisiche permanenti o condizioni di pericolosità).
- **B ratio (Bioaccumulation ratio)**^N. Il rapporto adimensionale tra i valori di concentrazione specie-specifici misurati in campioni di licheni nativi e i corrispondenti valori di concentrazione di background (*BEC*).
- **Bioaccumulo**. Processo mediante cui una sostanza presente nell'ambiente (nell'aria, nell'acqua o nel suolo) si accumula sulla superficie o all'interno di un organismo. I composti accumulati si ritrovano nell'organismo bioaccumulatore generalmente in concentrazioni maggiori rispetto a quelle osservate nella matrice ambientale di riferimento.
- **Biomonitoraggio**. Insieme delle tecniche volte a valutare gli effetti dell'inquinamento o di altri cambiamenti ambientali sulla componente biotica dell'ecosistema.
- **Campionamento probabilistico**. Parte di una pratica statistica riguardante la selezione di osservazioni individuali, con probabilità nota, intesa a fornire conoscenze su una popolazione di interesse, specialmente ai fini dell'inferenza statistica.
- **Campione esposto**^T. Campione derivante dalla selezione casuale di talli dal materiale lichenico iniziale, esposto per un periodo di tempo noto nell'area di studio e destinato a essere analizzato per valutare il contenuto degli elementi target.
- **Campione non esposto**^T. Campione derivante dalla selezione casuale di talli dal materiale lichenico iniziale e destinato a essere analizzato per stabilire la concentrazione degli elementi target nell'area di background.
- **Dominio di studio**. Area geografica che include tutte le parti campionabili dell'area studio. Può coincidere con quest'ultima nel caso in cui l'area di studio sia completamente campionabile.
- **Epifita**. Organismo vegetale che cresce sulla superficie di una pianta, dipendente dal supporto meccanico, ma che non riceve nutrienti dalla pianta su cui cresce.
- **Espositore**^T. Ogni dispositivo utilizzato come supporto per talli interi o porzioni di tallo durante il trapianto.
- **EU ratio (Exposed-to-Unexposed ratio)**^T. Il rapporto adimensionale tra i valori di concentrazione specie-specifici misurati nei campioni lichenici esposti e i corrispondenti valori di concentrazione misurati in campioni non esposti.
- **Lichene foglioso**. Lichene con morfologia simile a una foglia, piatto e aderente al substrato.
- **Lichene fruticoso**. Lichene a sviluppo tridimensionale, simile a un cespuglio, ascendente o pendulo, fissato al substrato alla sua base.
- **Lichene**. Associazione simbiotica ecologicamente obbligata, stabile e autosufficiente di un fungo (il micobionte, generalmente un ascomicete) e di una o più popolazioni di alghe verdi e/o cianobatteri (i fotobionti), che forma una struttura vegetativa stabile (tallo) con una morfologia definita.
- **Lichene nativo**^N. Lichene cresciuto in un'area di studio di interesse.
- **Materiale lichenico iniziale**^T. L'insieme dei talli lichenici considerati idonei e raccolti nell'area di background.
- **Materiale Standard di Riferimento (MSR)**. Materiale certificato utilizzato per controllare la qualità delle misure analitiche (p. es. BCR 482 '*Pseudevernia furfuracea*', IAEA-336 '*Evernia prunastri*').
- **Sorgente diffusa di inquinamento**. Insieme di diverse fonti inquinanti estese (p. es. riscaldamento domestico, attività agricole, traffico veicolare), in opposizione alle sorgenti puntiformi di inquinamento.
- **Sorgente puntiforme di inquinamento**. Sorgente identificabile di inquinamento atmosferico

caratterizzata da un'estensione così limitata da poter essere approssimata ad un punto in un modello matematico.

- **Specie arborea substrato.** Specie arborea che ospita la specie lichenica selezionata per lo studio di biomonitoraggio.
- **Strato.** Nell'ambito di un campionamento stratificato, sotto-popolazione statistica omogenea, qui intesa come determinata da un criterio di stratificazione (variabile quantitativa o qualitativa), all'interno di una popolazione eterogenea.
- **Trapianto lichenico**^T. Tecnica che prevede la raccolta di materiale lichenico in un'area di background e la successiva esposizione di campioni lichenici per un certo lasso di tempo in un'area di studio di interesse.
- **Unità di Campionamento (UC).** In questo contesto una Unità di Campionamento è la porzione del dominio di studio (p. es. plot circolare) in cui i campioni lichenici sono raccolti (nativi) o esposti (trapianti).
- **Valori di concentrazione elementare di background (*Background Element Concentration, BEC*).** Valori di concentrazione specie-specifici misurati in campioni lichenici che riflettono condizioni prossimo-naturali inalterate.

2.3 Materiale occorrente

2.3.1 *Materiale necessario per la preparazione del lavoro di campo*

- *Mappe.* Si rendono necessarie mappe caratterizzate da differenti scale cartografiche: le mappe a piccola scala sono necessarie per la rappresentazione complessiva dell'area di studio (p. es. 1:250.000, 1:100.000, in base dell'estensione della stessa); le mappe a grande scala (1:25.000, 1:10.000, e 1:5.000) sono essenziali per la localizzazione delle UC. Possono risultare utili anche mappe vegetazionali, mappe di uso del suolo (p. es. Corine Land Cover, Bossard et al., 2000, <http://land.copernicus.eu/>), immagini aeree e mappe di pianificazione territoriale.
- *Sistema Informativo Geografico (GIS).* Sistema per l'archiviazione, l'analisi e la presentazione dell'informazione spaziale e geografica.
- *Programma statistico.* Algoritmi per il campionamento casuale.

2.3.2 *Attrezzatura utile per il lavoro di campo*

- *Schede di campo* (Allegato D).
- *Mappe.*
- *Bussola-clinometro.*
- *Ricevitore GPS.*
- *Scalpello in acciaio inossidabile.*
- *Cesoie e forbici telescopiche per potatura.*
- *Lente d'ingrandimento.*
- *Metro.*
- *Guanti in lattice senza talco.*
- *Buste di carta.*
- *Scala.*
- *Fascette di plastica.*
- *Macchina fotografica.*
- *Recipienti in materiale inerte (es. piastre Petri).*

2.3.3 *Materiale utile per le procedure di laboratorio*

Selezione del materiale lichenico

- *Carta da filtro.*
- *Comuni utensili di laboratorio* (es. pinzette in plastica e acciaio, forbici e coltelli in ceramica, ecc.).
- *Stereomicroscopio.*

-
- *Bilancia di precisione.*
 - *Guanti in lattice senza talco.*

Conservazione

- *Gel di silice.*
- *Macchina sottovuoto da laboratorio.*
- *Congelatore (-20°C).*
- *Contenitori sigillabili da laboratorio in plastica o vetro.*

Macinazione

- *Stufa.*
- *Mortajo e pestelli in agata o ceramica.*
- *Azoto liquido.*
- *Mulino planetario a sfere.*
- *Spatole in acciaio.*
- *Comuni utensili di laboratorio (vedere sopra).*

Preparazione degli espositori ^T

- *Aste in legno o acciaio*
- *Reticelle di plastica.*
- *Filo da pesca.*
- *Fascette di plastica.*
- *Comuni utensili di laboratorio (vedi sopra).*

3. LINEE GUIDA PER IL BIOACCUMULO DI ELEMENTI MEDIANTE LICHENI NATIVI

Queste Linee Guida descrivono le azioni da intraprendere per l'implementazione del metodo dei licheni nativi (*in situ*) per monitorare il bioaccumulo di macro-elementi ed elementi in traccia. In particolare vengono descritti protocolli e procedure consolidate per tutte le fasi di una campagna di biomonitoraggio basata sui licheni nativi, dal campionamento dei licheni fino alla preparazione dei campioni propedeutica alla determinazione analitica delle concentrazioni degli elementi target (un diagramma di flusso con le fasi principali del metodo è riportato nell'Allegato A, Fig. A1). Questo capitolo include anche specifiche indicazioni per l'espressione dei risultati, nonché uno strumento ad hoc per una loro congrua interpretazione.

3.1 Caratterizzazione dell'area studio

L'area di studio dovrà essere caratterizzata accuratamente in termini di estensione, uso del suolo, antropizzazione, topografia, condizioni meteo-climatiche e presenza di sorgenti puntiformi e diffuse di inquinamento (par. 2.2). Tutte le mappe tematiche e i *layer* GIS (par. 2.2) dovranno essere il più possibile aggiornati e sarà altresì necessario specificarne la fonte. Per le elaborazioni cartografiche il sistema di riferimento e il tipo di coordinate utilizzati andranno sempre specificati, ma si consiglia comunque l'uso del sistema WGS 84 con proiezione cartografica UTM.

Il grado di eterogeneità del dominio di studio (par. 2.2) potrà essere valutato sulla base di diverse variabili quali l'altitudine, l'uso del suolo, la densità della popolazione residente, la vegetazione, ecc.; le variabili ecologiche considerate per tale valutazione dovranno essere esplicitamente dichiarate.

3.2 Disegno di campionamento

Fatto salvo l'utilizzo di un approccio campionario di tipo probabilistico, possono essere adottati diversi disegni di campionamento. Il disegno più appropriato deve essere deciso sulla base delle caratteristiche dell'area di studio (grado di eterogeneità del territorio) e dell'obiettivo dello studio (par. 2.1.2), tenendo in considerazione i seguenti aspetti:

- La distribuzione di alberi potenzialmente idonei nell'area di studio (gli alberi standard, par. 2.2, 3.3.1), che deve essere il più possibile nota, p. es. utilizzando immagini aeree o fonti di informazioni analoghe o mediante un'ispezione preliminare dell'area di studio.
- La distribuzione della specie lichenica selezionata nell'area di studio.
- I modelli diffusionali dei principali inquinanti che insistono sull'area di studio, qualora disponibili.
- L'eventuale presenza di aree ad accesso limitato, come proprietà private, aree militari, ecc., che deve essere controllata preliminarmente, al fine di escludere eventuali aree non campionabili (par. 2.2) dal dominio di studio e definire di conseguenza la popolazione target.

Nota. Esempi di metodi di campionamento utilizzabili e criteri di inclusione/esclusione delle UC sono riportati nell'Allegato F.

3.2.1 Unità di campionamento (UC)

Le caratteristiche delle UC (par. 2.2) vanno selezionate sulla base della distribuzione degli alberi potenzialmente idonei all'interno dell'area di studio. Sono consentite due opzioni:

Campionamento basato sui plot (*plot sampling*): ogni plot rappresenta un'UC. Poiché la dimensione del plot selezionata dipende dalla densità degli alberi nel dominio di studio, in biomonitoraggi diversi potrebbero essere utilizzati plot con dimensioni diverse, ma si consigliano comunque plot di campionamento circolari con un raggio compreso tra 30 m e 250 m. Nell'ambito della stessa indagine di biomonitoraggio, i plot devono però avere la stessa forma e dimensione. Ogni plot dovrà essere centrato in corrispondenza delle coordinate di un punto di campionamento precedentemente selezionato.

Campionamento basato sugli alberi (*tree-based sampling* o *plot-less sampling*): una UC è rappresentata da un singolo albero o da un gruppo di alberi.

3.2.2 Densità campionaria

Il numero minimo di UC deve essere calcolato sulla base delle equazioni disponibili per il calcolo delle dimensioni campionarie per diversi tipi di disegno di campionamento (p. es. Elzinga et al., 2001). Di solito, queste formule richiedono informazioni preliminari sulla variabilità dei dati in un'area di studio ottenibili tramite studi pilota e/o dalla revisione dei dati di campagne precedenti (o da indagini effettuate in aree comparabili). Per calcolare la densità campionaria, sono inoltre necessari ulteriori input per specificare la precisione richiesta/desiderata.

3.2.3 Specie licheniche idonee

Nell'ambito di ciascuno studio si raccomanda, se possibile, di utilizzare una singola specie di lichene. Potenzialmente, tutti i licheni epifiti fogliosi e fruticosi possono essere considerati. La scelta deve essere guidata da vari criteri, tra cui:

- *Stato di protezione*: la specie selezionata non deve essere una specie protetta (Lista Rossa IUCN o qualsiasi altro elenco di protezione nazionale o regionale). A tal proposito l'operatore dovrà essere a conoscenza dello status di conservazione della specie prima di intraprendere lo studio.
- *Abbondanza*: la specie selezionata deve essere sufficientemente abbondante nell'area di studio per preservare la popolazione e fornire una quantità sufficiente di biomassa per le analisi chimiche (eventualmente anche per indagini ripetute nel tempo; caso ii, par. 2.1.2).
- *Ubiquità*: per studi condotti su aree molto estese, la presenza diffusa delle specie selezionate deve essere la più ampia possibile.
- *Facilità di identificazione*: la specie selezionata deve essere di facile identificazione in campo con mezzi logistici minimi. Il campionamento richiede operatori che abbiano le competenze necessarie a tale scopo. Tuttavia, si suggerisce un'ulteriore verifica in laboratorio utilizzando delle chiavi di identificazione adeguate (si vedano i riferimenti bibliografici riportati nell'Allegato B).
- *Disponibilità di valori di concentrazione elementare di background (BEC)*: è preferibile selezionare specie per le quali siano già disponibili valori BEC (par. 2.2) per gli elementi di interesse. Si consiglia di fare riferimento a Cecconi et al. (2018, 2019a, 2019b).

Una breve descrizione delle specie licheniche più comunemente utilizzate negli studi di biomonitoraggio è riportata nell'Allegato B.

Nota. Nel caso in cui sia necessario utilizzare più di una specie per lo stesso studio di biomonitoraggio, si raccomanda uno specifico confronto tra le specie delle concentrazioni elementari bioaccumulate. In questo caso, all'interno di ciascuna UC dovrebbero essere raccolti campioni di tutte le specie selezionate. Ciò vale esclusivamente quando non sono disponibili valori BEC per le specie considerate (o per gli elementi di interesse).

3.3 Attività in campo

Nel paragrafo seguente sono descritte le operazioni da eseguire in campo nelle singole UC: tra queste la selezione di alberi standard, la raccolta e la conservazione del materiale lichenico per il trasporto in laboratorio.

3.3.1 Raccolta dei campioni

I campioni della specie selezionata possono essere raccolti sul tronco o sui rami di alberi standard (par. 2.2) al di sopra dei 100 cm dal suolo per evitare contaminazione terrigena. Deve essere evitata la raccolta di talli su nodi, parti di tronco danneggiate, parassitate o decorticate. Inoltre, non è consentito raccogliere contemporaneamente i talli da rami e tronchi, poiché posizioni diverse sull'albero possono influenzarne la composizione elementare (Adamo et al., 2008).

Durante il lavoro di campo, dovranno essere svolte le seguenti azioni all'interno di ciascuna UC:

- **Effettuare una ricognizione preliminare dell'UC.** Si dovrà effettuare una ricognizione preliminare al fine di valutare se sia disponibile una quantità sufficiente di materiale lichenico delle specie selezionate e di verificare il numero di alberi standard presenti.
- **Selezionare gli alberi standard.** Si dovranno selezionare gli alberi standard su cui raccogliere il materiale. In Fig. 3.1 sono riportati schematicamente i principali casi, in ordine decrescente (a-f) dall'opzione raccomandata a quella meno indicata:
 - a) Nell'UC sono presenti più di tre alberi standard (cinque nell'esempio) e la quantità di materiale lichenico della specie selezionata è sufficiente per la composizione di tre

- campioni analitici (par. 3.4). L'UC è campionabile. Si raccoglie il materiale da tutti gli alberi standard disponibili.
- b) Nell'UC sono presenti più di tre alberi standard (cinque nell'esempio), ma sui primi tre alberi è presente una quantità di materiale lichenico della specie selezionata sufficiente per la composizione di tre campioni analitici. L'UC è campionabile. Si raccoglie il materiale dai 3 alberi standard più vicini al centro dell'UC.
- c) Nell'UC sono presenti tre alberi standard e la quantità di materiale lichenico della specie selezionata è sufficiente per la composizione di tre campioni analitici. L'UC è campionabile. Si raccoglie il materiale dai tre alberi disponibili.
- d) Nell'UC sono presenti due alberi standard e la quantità di materiale lichenico della specie selezionata è sufficiente per la composizione di tre campioni analitici. L'UC è campionabile. Si raccoglie il materiale dai due alberi disponibili.
- e) Nell'UC è presente un solo albero standard e la quantità di materiale lichenico della specie selezionata è sufficiente per la composizione di tre campioni analitici. L'UC è campionabile. Si raccoglie il materiale dal solo albero disponibile.
- f) Nell'UC è presente (almeno) un albero standard, ma la quantità di materiale lichenico della specie selezionata non è sufficiente per la composizione di tre campioni analitici. Se il materiale è sufficiente per la composizione di uno o due campioni, l'UC è campionabile, ma in tal caso i risultati ad essa relativi andranno considerati con cautela. Se il materiale è insufficiente anche per la composizione di un campione, l'UC non è campionabile.
- g) Nell'UC non sono presenti alberi standard. L'UC non può essere rilevata.

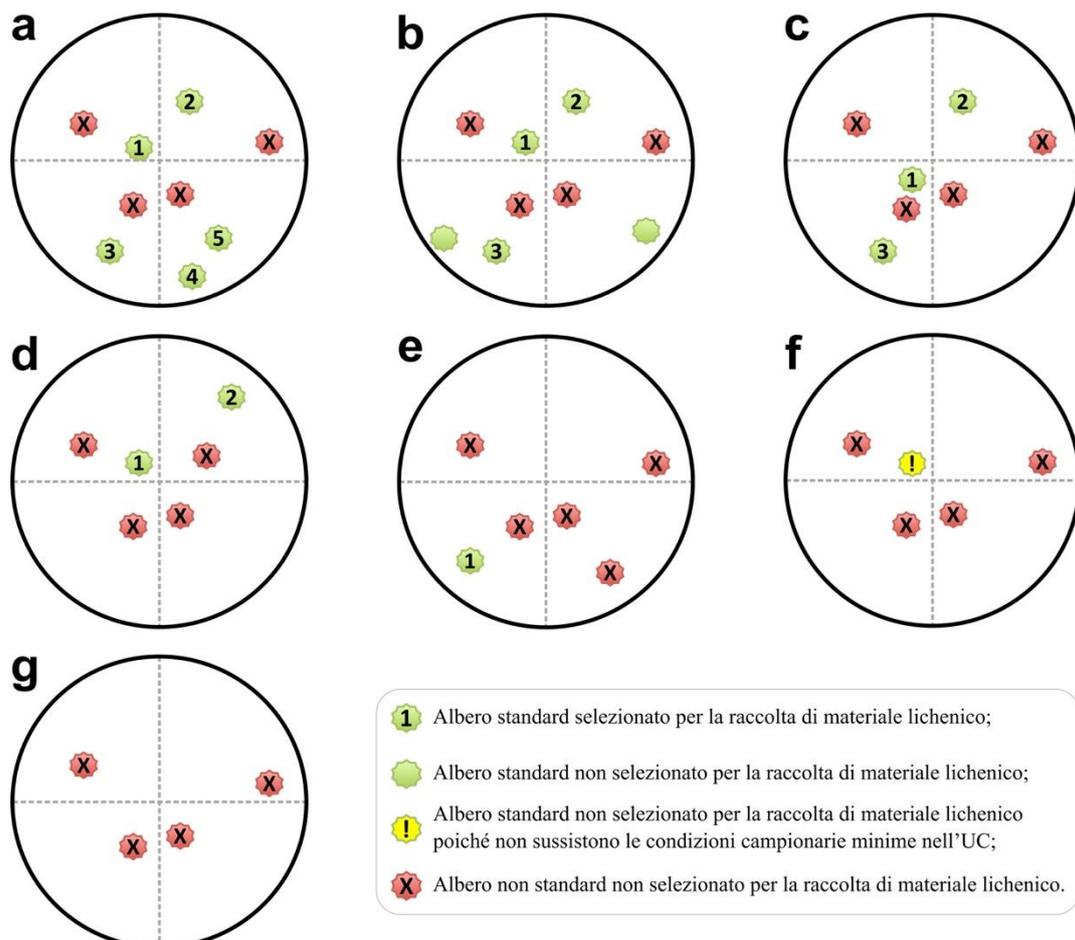


Figure 3.1 – Selezione degli alberi standard per la raccolta di materiale lichenico: casistica.

- **Raccogliere un minimo di tre campioni di materiale lichenico.** In questo contesto, un campione è definito come la quantità di parti marginali di talli lichenici, sufficiente a costituire un campione analitico di 200 mg. I campioni devono essere raccolti ad un'altezza dal suolo ≥ 100 cm. Non è fissato un limite massimo di altezza dal suolo per la raccolta, fatto salvo che sia sempre garantita una procedura sicura di raccolta.

I campioni di licheni devono essere raccolti usando strumenti privi di contaminanti (p. es. coltello o scalpello con lama in acciaio inossidabile o ceramica), indossando guanti privi di talco e facendo attenzione a non rimuovere troppa corteccia.

Devono essere esclusi dalla raccolta talli molto piccoli (<1 cm di diametro), parti di tallo con corpi fruttiferi (apotec) o evidentemente danneggiati (ad esempio talli che mostrano clorosi o che sono ricoperti di alghe).

Nota. Durante il trasporto in laboratorio i campioni lichenici dovranno essere conservati in contenitori nuovi, sigillabili e pre-etichettati (p. es. buste di carta, piastre Petri etc.).

3.4 Preparazione dei campioni analitici

Nei paragrafi seguenti vengono riportate le operazioni da eseguire in laboratorio, inclusa la pulizia, la selezione del materiale lichenico, l'omogeneizzazione e la conservazione dei campioni.

Entro 24 ore dalla raccolta, i campioni di licheni devono essere essiccati all'aria fino a raggiungere un peso costante, lasciandoli asciugare in un ambiente protetto, a temperatura ambiente (<40 °C).

Prima della pulizia, il materiale deve essere mantenuto asciutto, in un ambiente chiuso e pulito. Se la pulizia non può essere eseguita entro 7 giorni, i talli devono essere conservati nel congelatore e quindi scongelati al momento della pulizia, che verrà comunque effettuata entro 24 mesi dal congelamento del campione.

3.4.1 Selezione del materiale lichenico idoneo

Le parti più esterne del tallo (senza corpi fruttiferi, non infette da funghi lichenicoli o ricoperte da alghe epifite) devono essere selezionate e ripulite da materiale estraneo mediante uno stereomicroscopio e delle pinzette in plastica o acciaio inox. La lunghezza delle parti più esterne da selezionare è specie-specifica e varia in base alla dimensione e alla forma della specie selezionata (Allegato B).

Questa operazione è particolarmente importante per la successiva determinazione della concentrazione degli elementi nel campione e deve pertanto essere effettuata con molta attenzione. I campioni non devono essere lavati per evitare di perdere particelle intrappolate sulla superficie del lichene e perché è stato dimostrato che la procedura di lavaggio può alterare imprevedibilmente la composizione elementare dei licheni (Bettinelli et al., 1996). Nei licheni fogliosi (par. 2.2), alcuni metalli possono accumularsi in maniera non omogenea in zone del tallo di età diversa, cioè con diverso tempo di esposizione (Hale & Loawrey, 1985; Bargagli et al., 1987; Nimis et al., 2001). Per questo motivo, a seconda del tipo di studio, si potrebbero dover prendere in considerazione parti diverse dei campioni di licheni: ad esempio, nei licheni fogliosi, i 3 mm più esterni del tallo sono la parte più attiva fisiologicamente e corrispondono allo sviluppo avvenuto approssimativamente in un anno di tempo (Tretiach & Carpanelli, 1992).

3.4.2 Polverizzazione e omogeneizzazione dei campioni

Ogni campione deve essere polverizzato o tritato finemente (omogeneizzato). La polverizzazione può essere eseguita manualmente o tramite dispositivi di macinazione automatizzati (p. es. mulini a sfere; par. 2.3.3).

La polverizzazione manuale viene effettuata immergendo i campioni in c. 50 ml di azoto liquido e macinandoli in un mortaio di agata o ceramica.

L'uso di materiali di macinazione privi di contaminanti è di primaria importanza. Si dovrà altresì porre particolare attenzione nella pulizia di contenitori, mortai e strumentazione accessoria tra cicli successivi di macinazione.

Il materiale polverizzato dovrà essere riposto all'interno di appositi contenitori di laboratorio in plastica o vetro, non contaminati e sigillabili.

Nota. Dopo la polverizzazione, la massa dei campioni non deve essere inferiore a 200 mg.

3.4.3 Determinazione del peso secco

L'essiccazione dei campioni polverizzati ha il duplice scopo di proteggerli dalla decomposizione microbica in caso di un loro successivo stoccaggio e di acquisire un valore di riferimento costante, in contrapposizione al peso fresco. I campioni polverizzati o tritati devono essere essiccati in forno a 105°C per almeno 7 ore per ottenere un contenuto di umidità pari a circa l'8% (Quevauviller et al.,

1996). Limitatamente a elementi volatili come il mercurio, la determinazione del peso secco deve essere eseguita a temperature più basse al fine di prevenire la possibile perdita di specie volatili. In questo caso, l'essiccazione può essere effettuata a 40-50°C per 24 ore (Markert, 1995). Inoltre, nel caso di indagini destinate esclusivamente al mercurio, gli operatori devono considerare l'uso di sistemi di analisi dedicati come i Flow Injection Mercury Systems (Adamo et al., 2008) o la tecnica di combustione/trappola (ad esempio, i campioni solidi possono essere analizzati per combustione e successivo intrappolamento di mercurio su oro e analisi mediante spettroscopia di assorbimento atomico, senza necessità di mineralizzazione con acido liquido; Roos-Barraclough et al., 2002).

3.4.4 Conservazione dei campioni

I campioni analitici possono essere conservati, assicurandosi che il metodo e la durata di conservazione non influenzino la concentrazione dell'elemento. I campioni polverizzati vengono in genere sigillati in tubi di plastica o eppendorf e conservati lontano da fonti di calore fino alla determinazione analitica.

Nota. Dopo lo stoccaggio a bassa temperatura, i campioni devono essere scongelati in gel di silice per evitare la formazione di umidità. Nel caso di contaminanti volatili, la determinazione analitica dovrà essere effettuata il prima possibile.

3.5 Procedure analitiche

3.5.1 Analisi chimiche

La determinazione analitica può essere effettuata mediante diverse tecniche. I laboratori incaricati dovranno essere accreditati per l'analisi di matrici vegetali, avere comprovata esperienza nel trattamento di matrici complesse e adottare appropriate misure per l'assicurazione della qualità delle procedure. Si suggerisce l'uso di un Materiale Standard di Riferimento (MSR, par. 2.2) specifico per matrici licheniche (p. es. BCR 482 "*Pseudevernia furfuracea*", IAEA-336 "*Evernia prunastri*"; Stone et al., 1995; Quevauviller et al., 1996).

3.5.2 Metodo di digestione

Qualora richiesto dalla tecnica analitica selezionata, i campioni polverizzati andranno mineralizzati tramite digestione acida prima della determinazione analitica. In particolare, si dovrà effettuare una digestione 'totale' con acido fluoridrico (p. es., HF/HNO₃/HCl: EN 13656; SW-846 EPA Metodo 3052), dal momento che questo acido forte assicura in genere un miglior recupero (ed una più elevata accuratezza analitica) per elementi presenti negli alluminosilicati e in altri minerali tipicamente resistenti ad attacchi acidi senza HF (Yafa & Farmer, 2006; Cecconi et al., 2019b).

3.6 Espressione dei risultati

I risultati di una campagna di biomonitoraggio sono i valori di concentrazione elementare misurati in campioni lichenici ed espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. Il contenuto elementare dev'essere riportato sotto forma di dato grezzo (ovvero, $n \geq 3$ valori di concentrazione per UC; par. 3.3.2; Fig. 3.3). Oltre al dato grezzo, si devono riportare anche i valori medi e le incertezze associate per ogni UC (Fig. 3.3).

Allo scopo di valutare l'arricchimento elementare in una UC e a fini interpretativi (par. 3.7), i valori di concentrazione elementare medi nei campioni lichenici devono essere espressi rispetto ai valori di concentrazione elementare di background (*BEC*, si veda la definizione al par. 2.2) in termini del cosiddetto *B ratio* (formula 3.1; definizione al par. 2.2; Cecconi et al., 2019a).

Valori *BEC* nazionali, specie-specifici e metodologicamente uniformi sono disponibili per *Flavoparmelia caperata* e *Xanthoria parietina*, le specie più utilizzate in applicazioni di biomonitoraggio basate su licheni nativi; questi valori sono riportati in Tabella 3.1 rispettivamente per due set di 11 e 10 elementi di interesse ambientale. Per dettagli sulla costruzione dei *BEC*, si veda Cecconi et al. (2019a).

Nota. *BEC* regionali e metodologicamente uniformi sono disponibili anche per la specie fruticosa *Pseudevernia furfuracea* per 43 elementi; in questo caso vengono forniti due set di valori *BEC*, rispettivamente ottenuti tramite digestione totale, con HF (Cecconi et al., 2019b), e tramite digestione parziale, senza HF (Cecconi et al., 2018).

Tabella 3.1 – Valori di concentrazione elementare di background per specie di uso comune nel biomonitoraggio tramite licheni nativi.

BEC per *Flavoparmelia caperata* e *Xanthoria parietina* e la loro incertezza associata (Δ_{BEC}) espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$. L'incertezza associata ai valori *BEC* è espressa in termini di deviazione standard (n.d., dato non disponibile).

Elemento	<i>Flavoparmelia caperata</i>		<i>Xanthoria parietina</i>	
	<i>BEC</i>	Δ_{BEC}	<i>BEC</i>	Δ_{BEC}
Al	253	37	372	59
As	0.18	0.03	0.15	0.02
Cd	0.18	0.03	0.07	0.01
Cr	1.17	0.24	1.61	0.28
Cu	6.2	0.9	4.5	0.3
Hg	0.057	0.021	0.035	0.009
Ni	1.27	0.20	1.64	0.22
Pb	2.37	0.45	1.00	0.21
Ti	19.5	5.8	37.3	7.3
V	0.75	0.11	n.d.	n.d.
Zn	35.3	4.3	21.3	2.6

Per la *i*-esima UC ($i = 1, \dots, N$) e un elemento generico *y*, per cui sono disponibili *n* misure ($j = 1, \dots, n$), il valor medio del *B ratio* è dato da:

$$B^{(i)} = \frac{y^{(i)}}{y_{BEC}} \quad (3.1)$$

$y^{(i)} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n y_j^{(i)}$: media degli *n* valori di concentrazione misurati nei campioni della *i*-esima UC ($n \geq 3$);
 y_{BEC} : valore *BEC* nazionale specie-specifico (Tabella 3.1).

3.7 Interpretazione dei risultati

Al fine di valutare la severità dei fenomeni di inquinamento in un'area di studio, i risultati del biomonitoraggio devono essere soggetti ad adeguata trattazione statistica. Inoltre, i risultati espressi come *B ratio* (par. 2.2 e 3.6) devono essere interpretati per mezzo di strumenti interpretativi ad hoc.

3.7.1 Analisi statistiche basilari per dati di biomonitoraggio

I risultati di una campagna di biomonitoraggio (sia espressi in termini di concentrazione elementare media o di *B ratio* in ciascuna UC, formula 3.1) possono essere analizzati per mezzo di statistiche univariate e multivariate e modelli non parametrici (Brunialti & Frati, 2007). I dati, in forma di matrici di concentrazione elementare nelle UC, sono generalmente analizzati tramite tecniche statistiche di uso consolidato per l'identificazione di sorgenti emmissive, quali analisi di correlazione, analisi dei gruppi (*Cluster Analysis*) e delle componenti principali (*Principal Component Analysis*) (Bargagli & Mikhailova, 2002). I dati di bioaccumulo possono inoltre essere rappresentati tramite mappe bidimensionali utilizzando appositi software (Allegato H).

Gli strumenti statistici e le procedure di *mapping* dovrebbero consentire l'identificazione di (i) pattern spaziali di contenuto elementare nei campioni lichenici, (ii) trend temporali di contenuto elementare nel caso di campagne ripetute e (iii) contaminazione terrigena dei campioni dovuta a fenomeni di risospensione del particolato legato al suolo.

Nota. La contaminazione terrigena può puntualmente essere messa in evidenza tramite il cosiddetto fattore di arricchimento (*Enrichment Factor*, EF), che confronta la concentrazione di un analita accumulato nei campioni lichenici con quella in campioni di suolo (Bargagli & Mikhailova, 2002). In questo caso il campionamento del suolo dovrà seguire linee guida specifiche (p. es. Icp-forests.net) e i campioni di suolo dovranno essere analizzati con la medesima tecnica analitica utilizzata per i licheni.

3.7.2 Strumento interpretativo: la scala di bioaccumulo per i licheni nativi

Una scala interpretativa è uno strumento fondamentale per interpretare adeguatamente la severità dei fenomeni di inquinamento. Una ‘Scala di Bioaccumulo’ per risultati di biomonitoraggio tramite licheni nativi è fornita in Cecconi et al. (2019a) ed è qui riportata in Tabella 3.2. La scala si basa sull’analisi della distribuzione di centinaia di record di *B ratio* raccolti dalla letteratura e consta di cinque classi corrispondenti a livelli crescenti di bioaccumulo in licheni nativi. I limiti inferiori e superiori delle classi si riferiscono ai valori corrispondenti al 25°, 75°, 90° e 95° percentile della distribuzione del *B ratio* (per dettagli si veda Cecconi et al., 2019a).

Tabella 3.2 – Scala di bioaccumulo per i licheni nativi.

Scala di bioaccumulo con classi, descrizioni, soglie percentile e corrispondenti valori di *B ratio*, nonché i codici RGB e HTML per i colori da associare alle diverse classi di bioaccumulo.

Classi di bioaccumulo		Soglie percentili	<i>B ratio</i>	Codice del colore	
ID	Descrizione			RGB	HTML
1	Assenza di bioaccumulo	$\leq 25^{\text{th}}$	≤ 1.0	0, 0, 255	#0000FF
2	Bioaccumulo basso	(25 th , 75 th]	(1.0, 2.1]	0, 128, 0	#008000
3	Bioaccumulo moderato	(75 th , 90 th]	(2.1, 3.4]	255, 243, 15	#FFF30F
4	Bioaccumulo elevato	(90 th , 95 th]	(3.4, 4.9]	255, 0, 0	#FF0000
5	Bioaccumulo severo	$> 95^{\text{th}}$	> 4.9	128, 0, 64	#800040

3.7.3 Attribuzione della classe di bioaccumulo all’Unità di Campionamento

L’attribuzione della classe di bioaccumulo (Tabella 3.2) ad una UC dev’essere effettuata sulla base del valore medio del *B ratio* (formula 3.1, par. 3.6) diminuito della sua incertezza $\Delta(B^{(i)})$. Quindi, per la *i*-esima UC, la corrispondente classe di bioaccumulo è determinata in base al valore assunto da $B^{(i)} - \Delta(B^{(i)})$ (Fig. 3.2), dove $\Delta(B^{(i)})$ è ottenuta propagando l’incertezza associata a $y^{(i)}$ e y_{BEC} (si veda il par. 3.6 per le definizioni).

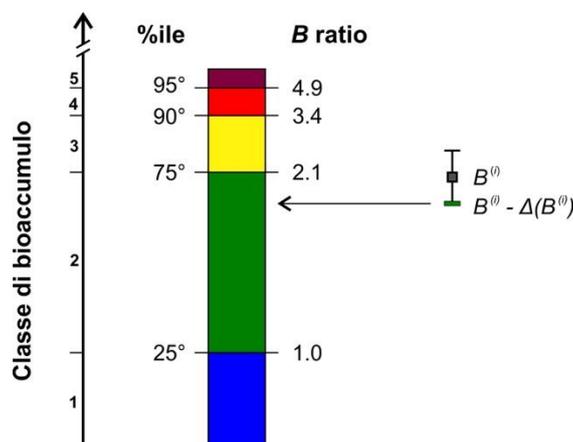


Figura 3.2 - Modalità di attribuzione della classe di bioaccumulo ad una UC.

Soglie percentile e corrispondenti valori di *B ratio* della scala di bioaccumulo per i licheni nativi.

Per poter calcolare $\Delta(B^{(i)})$, l’operatore deve conoscere: (i) l’incertezza associata al valore *BEC* elemento-specifico, cioè $\Delta(y_{BEC})$ e (ii) l’incertezza associata al contenuto elementare medio rivelato nella *i*-esima UC, cioè $\Delta(y^{(i)})$. La prima è fornita in Tabella 3.1, mentre l’ultima può essere calcolata assumendo una distribuzione triangolare per i dati di concentrazione elementare, dal momento che tale distribuzione è ampiamente utilizzata in ecologia per calcolare l’incertezza di misura in caso di limitata numerosità campionaria (Physics.nist.gov). In particolare $\Delta(y^{(i)})$ si ottiene calcolando la differenza tra il valore di concentrazione massimo e minimo all’interno della UC e dividendo tale differenza per $\sqrt{6}$ (formula 3.2, con fattore di copertura $k = 2$, che garantisce limiti fiduciali al 95%).

$$\Delta(y^{(i)}) = k \left(\frac{\max\{y_j^{(i)}\} - \min\{y_j^{(i)}\}}{2\sqrt{6}} \right) = \frac{\max\{y_j^{(i)}\} - \min\{y_j^{(i)}\}}{\sqrt{6}} \quad (3.2)$$

$\max\{y_j^{(i)}\}$: massimo tra gli n valori di concentrazione misurati nei campioni della i -esima UC;
 $\min\{y_j^{(i)}\}$: minimo tra gli n valori di concentrazione misurati nei campioni della i -esima UC.

Infine, $\Delta(B^{(i)})$ può essere facilmente calcolato in base alla formula 3.3.

$$\Delta(B^{(i)}) = B^{(i)} \sqrt{\left(\frac{\Delta(y^{(i)})}{y^{(i)}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta(y_{BEC})}{y_{BEC}}\right)^2} \quad (3.3)$$

Esempio numerico

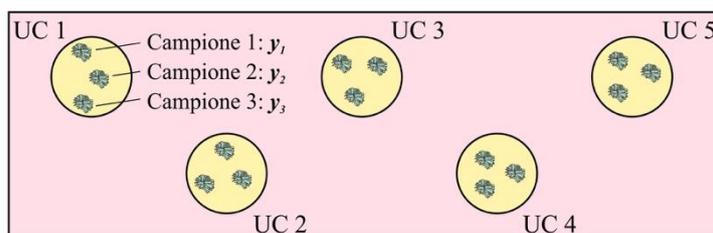
Si supponga di voler valutare il livello di bioaccumulo di nichel (Ni) in campioni di *Flavoparmelia caperata* in $N = 5$ UC in un'area di studio, avendo $n = 3$ campioni in ciascuna UC (Fig. 3.3). A scopo di generalizzazione, le concentrazioni medie di Ni nelle UC e il valore *BEC* corrispondente saranno indicati rispettivamente come y e y_{BEC} (Fig. 3.3).

Valori di background Nichel (Ni)



$$y_{BEC} \pm \Delta(y_{BEC}) = 1.27 \pm 0.20 \mu\text{g g}^{-1}$$

Area di studio



UC	y_1 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y_3 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$\Delta(y)$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	1.22	1.90	1.77	1.63	0.28
2	2.20	2.61	2.59	2.47	0.17
3	2.88	2.32	2.70	2.63	0.23
4	4.66	3.82	4.53	4.34	0.34
5	2.39	1.74	2.65	2.26	0.37

Figura 3.3 - Esempio numerico: dati iniziali.

Valori *BEC* medi e incertezza associata (y_{BEC} e $\Delta(y_{BEC})$) per l'elemento Ni (Tabella 3.1), nonché i valori di concentrazione (y_j) misurati negli $n = 3$ campioni raccolti in ciascuna delle 5 UC, i loro valori medi e le incertezze associate (y e $\Delta(y)$).

Dal dataset esemplificativo in Fig. 3.3, l'applicazione delle formule 3.1 - 3.3 consente facilmente di calcolare la media del *B ratio*, l'incertezza associata e la loro differenza ($B - \Delta(B)$), permettendo perciò l'attribuzione della classe di bioaccumulo alle UC (Tabella 3.2; Fig. 3.4).

UC	B	$\Delta(B)$	$B - \Delta(B)$	Classe
1	1.28	0.30	0.99	1
2	1.94	0.33	1.61	2
3	2.07	0.37	1.70	2
4	3.41	0.60	2.81	3
5	1.78	0.41	1.37	2

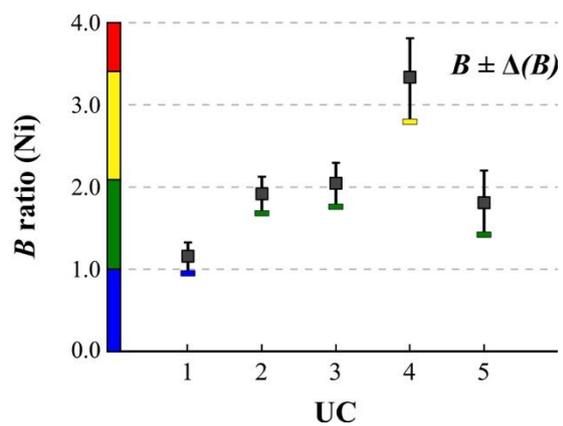


Figura 3.4 - Esempio numerico: output finale.

B ratio e incertezze associate per l'elemento Ni nelle 5 UC. Si riporta anche la loro differenza, utilizzata per la determinazione della classe di ciascuna UC, unitamente ad una rappresentazione grafica dell'output.

4. LINEE GUIDA PER IL BIOACCUMULO DI ELEMENTI MEDIANTE TRAPIANTI LICHENICI

Queste Linee Guida descrivono le azioni da intraprendere per l'implementazione del metodo dei trapianti lichenici per monitorare il bioaccumulo di macro-elementi ed elementi in traccia. In particolare vengono descritti protocolli e procedure consolidate per tutte le fasi di una campagna di biomonitoraggio basata sui trapianti, dalla raccolta dei licheni in un'area di background, al loro trapianto in un'area di studio fino alla preparazione dei campioni propedeutica alla determinazione analitica degli elementi selezionati (un diagramma di flusso con le fasi principali del metodo è riportato nell'Allegato A, Fig. A2). Questo capitolo include anche specifiche indicazioni per l'espressione dei risultati, nonché uno strumento ad hoc per una loro congrua interpretazione.

4.1 Esposizione dei licheni nell'area di studio: pianificazione

4.1.1 *Caratterizzazione dell'area di studio*

L'area di studio dovrà essere caratterizzata accuratamente in termini di estensione, uso del suolo, antropizzazione, topografia, condizioni meteo-climatiche e presenza di sorgenti puntiformi e diffuse di inquinamento. Tutte le mappe tematiche e i *layer* GIS (par. 2.2) dovranno essere il più possibile aggiornati e sarà altresì necessario specificarne la fonte. Per le elaborazioni cartografiche il sistema di riferimento e le coordinate utilizzati andranno sempre specificati, ma si consiglia comunque l'uso del sistema WGS 84 con proiezione cartografica UTM. Una corretta caratterizzazione dell'area di studio dovrà consentire l'individuazione delle aree non campionabili (par. 2.2).

4.1.2 *Disegno di campionamento*

Nel metodo dei trapianti lichenici, i campioni vengono esposti nell'area di studio per un periodo di tempo definito (la durata dell'esposizione, cfr. par. 4.1.5) seguendo un disegno di campionamento probabilistico definito a priori (d'ora in poi, metodo di campionamento; Allegato F).

I siti espositivi (cioè le Unità di Campionamento, UC, par. 2.2) sono identificati attraverso una coppia di coordinate geografiche corrispondenti al centro di un plot circolare. Sia le UC che i relativi campioni dovranno essere catalogati con un codice di identificazione alfanumerico univoco.

La scelta della tipologia del metodo di campionamento sarà determinata in base alle caratteristiche dell'area di studio, al tipo di sorgenti emissive e/o in base alla stima della massima accuratezza raggiungibile in relazione ai costi fissi (Elzinga et al., 2001).

Nota. Esempi di metodi di campionamento utilizzabili e criteri di inclusione/esclusione delle UC sono riportati nell'Allegato F.

4.1.3 *Raccomandazioni per l'esposizione dei campioni nelle UC*

In ogni UC dovranno essere esposti almeno tre campioni lichenici. Un campione corrisponde ad un certo numero di talli utili all'ottenimento di un'adeguata massa per la determinazione analitica (cfr. par. 4.3.2 e 4.5.2). I talli necessari per un campione possono essere trapiantati tal quali o assicurati ad un espositore (par. 2.2, 2.3.3, 4.3.2, Allegato C). Qualora si utilizzino degli espositori, un singolo espositore deve supportare un numero di talli utile alla costituzione di un singolo campione, perciò per esporre tre campioni in una UC, saranno necessari tre espositori.

In una UC i campioni (o gli espositori con i campioni) dovranno essere installati su supporti di campo, che possono essere alberi o supporti artificiali (p. es. lampioni o supporti appositamente costruiti). In ogni caso i campioni dovranno essere posizionati tra i 2 e i 4 m dal suolo, lontano da possibili fonti micro-contaminanti (p. es. grondaie, tetti e cavi elettrici); la metodologia di esposizione dovrà inoltre essere conservata per tutta la campagna di monitoraggio, garantendo perciò l'uso di un unico tipo di supporto (alberi o supporti artificiali), una sola tipologia di espositore e un'altezza da terra costante. L'orientamento cardinale (N, S, O, E) dei campioni o degli espositori sui loro supporti di campo deve essere determinato attraverso un processo di randomizzazione. Qualora i supporti naturali o artificiali scarseggino in una UC, i campioni lichenici dovranno comunque essere posizionati ad una distanza minima di 3 metri l'uno dall'altro (Allegato C, Fig. C1-e). Nel caso in cui si utilizzino i rami degli alberi come supporto, i campioni potranno essere esposti sia all'interno che all'esterno della chioma,

avendo cura di mantenere anche in questo caso la stessa metodologia in tutta l'area di studio.

4.1.4 Stima dello sforzo di campionamento nell'area di background

Per quantificare lo sforzo di campionamento nell'area di background (si veda la definizione al par. 2.2) gli operatori devono tenere in considerazione l'obiettivo dello studio (par. 2.1.2), l'estensione dell'area di studio e il numero totale di UC (par. 4.1.1), nonché il numero di campioni da esporre in una singola UC e il numero di campioni non esposti da analizzare (si vedano le definizioni di 'campione esposto' e 'non esposto' al par. 2.2). A tal proposito, e come regola generale, dovranno essere esposti almeno $n = 3$ campioni per UC (par. 4.1.3, 4.3.2), mentre $m > n$ campioni dovranno essere analizzati per la stima del contenuto elementare prima dell'esposizione (par. 4.2.2, 4.3.2, 4.7, Allegato G).

In generale, il materiale lichenico raccolto dovrebbe essere in quantità tale da assicurare la possibilità di (i) quantificare la variabilità della composizione elementare dei talli nella popolazione di origine (se richiesto; par. 4.2.2 e Allegato G), (ii) stimare la concentrazione elementare media nei campioni non esposti, e (iii) allestire almeno tre campioni lichenici per l'esposizione in ciascuna UC (par. 4.3.2, Allegato C).

4.1.5 Durata dell'esposizione

Si suggerisce di esporre i campioni per un periodo compreso fra le 4 e le 12 settimane (cfr. par. 4.8.2). La settimana deve essere sempre e comunque usata come unità di base per la quantificazione della durata dell'esposizione. Nel caso di monitoraggi ripetuti, la durata dell'esposizione dovrà essere mantenuta costante.

4.1.6 Informazioni supplementari

Si raccomanda caldamente di raccogliere informazioni riguardanti le condizioni meteorologiche e le concentrazioni di inquinanti prima e durante la campagna di biomonitoraggio, poiché potrebbero essere d'ausilio all'interpretazione dei pattern di bioaccumulo.

4.2 Prelievo del materiale lichenico

4.2.1 Specie licheniche idonee

Benché ai fini dell'approccio proposto possano essere utilizzati sia licheni epifiti fogliosi che fruticosi (si vedano le definizioni al par. 2.2), si raccomanda l'utilizzo di licheni fruticosi poiché tale forma di crescita assicura una quantità maggiore di materiale per tallo lichenico rispetto alle specie fogliose. Inoltre, i licheni fruticosi sono più semplici da pulire, selezionare e installare sugli espositori, perciò il loro utilizzo in genere riduce i tempi di processamento e incrementa l'omogeneità dei campioni e l'accuratezza dei dati (Wolterbeek & Bode, 1995). Una lista di specie utilizzabili suddivise in base alla forma di crescita è fornita in Allegato B.

Poiché specie licheniche diverse possono differire sia per contenuto elementare di background che per capacità di accumulo, nell'ambito di ciascuno studio si dovrà utilizzare una sola specie di lichene. La scelta della specie deve essere guidata dai seguenti criteri:

- *Stato di protezione*: la specie selezionata non deve essere una specie protetta (Lista Rossa IUCN o qualsiasi altro elenco di protezione nazionale o regionale). A tal proposito l'operatore dovrà essere a conoscenza dello status di conservazione della specie prima di intraprendere lo studio.
- *Abbondanza*: la specie selezionata deve essere sufficientemente abbondante nell'area di background (par. 2.2) per preservare la popolazione ed eventualmente per garantire la possibilità di svolgere indagini ripetute nel tempo (caso ii, par. 2.1.2).
- *Facilità di identificazione*: la specie selezionata deve essere di facile identificazione in campo con mezzi logistici minimi. Il campionamento richiede operatori che abbiano le competenze necessarie a tale scopo. Tuttavia, si suggerisce un'ulteriore verifica in laboratorio utilizzando delle chiavi di identificazione adeguate (si vedano i riferimenti bibliografici riportati

nell'Allegato B).

4.2.2 Caratterizzazione dell'area di background

L'area di background (par. 2.2) dovrebbe essere più omogenea possibile sotto il profilo ecologico e ambientale. La caratterizzazione ambientale dell'area sarà realizzata tramite una ricognizione preliminare in campo (un esempio di scheda di campo è riportato nell'Allegato D, Fig. D2) e mediante mappe tematiche di uso del suolo, vegetazione, copertura arborea, clima, altitudine (modelli digitali di elevazione) e litologia. Inoltre, è possibile valutare la presenza di specie licheniche sensibili all'inquinamento atmosferico per fornire ulteriori evidenze dell'assenza di fenomeni importanti di contaminazione.

Valutazione preliminare della variabilità del contenuto elementare nell'area di background

Quando un'area di background (par. 2.2) viene selezionata per la prima volta, è necessario uno studio pilota per determinare la variabilità del contenuto elementare nella popolazione lichenica di riferimento. A questo scopo, nell'Allegato G si riporta un metodo basato su una tecnica di ricampionamento che fornisce dei criteri per stabilire se un'area ha le caratteristiche per essere considerata "di background" o meno. Contestualmente, il metodo proposto consente di individuare il numero minimo di campioni da analizzare per ottenere un valore di riferimento affidabile per il materiale non esposto (contenuto elementare medio nell'area di background).

Nota. Una volta nota la variabilità della popolazione lichenica di riferimento, il numero minimo di campioni non esposti da analizzare può essere mantenuto costante per le successive campagne di biomonitoraggio.

Una buona pratica consiste nel confrontare il contenuto elementare medio dei campioni non esposti con stime di background specie-specifiche (qualora disponibili) o, alternativamente, con valori pubblicati relativi alla stessa specie raccolta in altre aree di background selezionate in base ad un criterio di prossimità geografica.

Le procedure descritte si rendono necessarie per minimizzare la probabilità di utilizzo di talli lichenici che, benché prelevati in aree remote, possono essere caratterizzati da concentrazioni elementari sensibilmente al di sopra del background nazionale a causa di anomalie geochemiche nell'area e/o del trasporto atmosferico di inquinanti su lunga distanza (Fratini et al., 2005).

4.2.3 Procedure per la raccolta dei licheni

I talli lichenici devono essere prelevati sulla corteccia di tronchi o rami di alberi substrato in buona salute, eretti o con inclinazione subverticale. Per incrementare l'omogeneità del campione e per evitare una contaminazione terrigena, i talli devono essere raccolti sugli alberi al di sopra di 100 cm dal suolo e, quando possibile, selezionando una singola specie arborea substrato (par. 2.2). Deve essere evitata la raccolta di talli su nodi, parti di tronco danneggiate o decorticate, così come su parti parassitate da funghi o insetti. Non è inoltre consentito raccogliere contemporaneamente i talli da rami e tronchi, poiché posizioni diverse sull'albero possono influenzarne la composizione elementare (Adamo et al., 2008).

I talli devono essere prelevati usando diversi strumenti e precauzioni in base alla forma di crescita della specie target.

- **Dal tronco.** Prelevare frammenti di corteccia colonizzati dai talli con un coltello o un bisturi di acciaio inossidabile, ponendo cura nel ridurre al minimo il danno per l'albero substrato.
- **Dai rami.** Tagliare porzioni di rami colonizzati dai talli con strumenti di acciaio inossidabile.

Qualsiasi informazione utile sui siti di raccolta dei licheni nell'area di background (par. 2.2) deve essere riportata dagli operatori sulla scheda di campo (Allegato D, Fig. D1).

Nota. Durante il trasporto in laboratorio il materiale lichenico dovrà essere conservato in contenitori nuovi, sigillabili e pre-etichettati (p. es. buste di carta, piastre Petri etc.).

4.2.4 Caratterizzazione morfometrica del materiale lichenico

Il contenuto elementare nei campioni dipende principalmente dall'intrappolamento di particolato dovuto a specifiche caratteristiche morfologiche dei talli. Di conseguenza, per migliorare l'omogeneità morfologica del materiale lichenico, va eseguita una caratterizzazione morfometrica dei talli sia in campo che successivamente in laboratorio. In particolare, la selezione di talli per l'esposizione

dovrebbe essere limitata a quelli caratterizzati da dimensioni, grado di ramificazione e rugosità delle superfici esterne (p. es. presenza/assenza di strutture riproduttive) comparabili.

4.3 Procedure di laboratorio

I paragrafi seguenti descrivono le operazioni da effettuare in laboratorio prima dell'esposizione dei campioni nell'area di studio.

4.3.1 Preparazione del materiale lichenico

Il materiale lichenico iniziale (si veda la definizione al par. 2.2) consiste in un pool di talli prelevati nell'area di background (par. 2.2) e preparati secondo i seguenti passaggi prima della loro esposizione nell'area di studio.

- **Essiccamento.** I talli devono essere essiccati all'aria in ambiente controllato a temperatura ambiente (<40°C). Una volta adottata, la procedura di essiccamento non dovrà essere modificata nelle campagne successive.
- **Pulizia.** I talli essiccati devono essere puliti da materiale estraneo (p. es. altre specie di muschi o licheni, residui di suolo, artropodi etc.) utilizzando guanti senza talco e strumenti idonei (p. es. pinzette in plastica o in acciaio inox etc., par. 2.3.3).
Nota. I talli non devono essere lavati o sottoposti a nessun altro tipo di pretrattamento che possa influenzare il contenuto degli elementi (Bettinelli et al., 1996).
- **Conservazione.** Il materiale lichenico può essere immediatamente utilizzato per la preparazione dei campioni lichenici (par. 4.3.2) oppure può essere conservato per essere utilizzato in un secondo momento. I talli possono essere mantenuti secchi a temperatura ambiente fino a due settimane. Alternativamente, i talli possono essere conservati per periodi di tempo più lunghi previo trattamento in gel di silice per 48 h (contenuto di acqua relativo <5-10%) e imballaggio sottovuoto; i talli così trattati possono essere conservati a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Honegger, 2003) fino a 24 mesi. Dopo una conservazione prolungata, si raccomanda di testare la vitalità dei talli lichenici attraverso l'utilizzo di classici test per la valutazione della fluorescenza clorofilliana (p. es. resa quantica massima della fotochimica primaria del fotobionte lichenico, F_v/F_m ; Jensen, 2002).

4.3.2 Preparazione dei campioni

Ogni campione è composto da talli scelti in maniera casuale dal materiale lichenico iniziale (par. 2.2). Il numero adatto di talli necessari per costituire un singolo campione è specie-specifico e dipende dalla dimensione e dalla forma della specie utilizzata. Durante la preparazione del campione, l'operatore deve considerare la perdita di materiale lichenico dovuta a (i) trattamento analitico del campione (par. 4.5.1 e 4.5.2) e (ii) l'esposizione nelle UC.

I campioni si suddividono in:

- **Campioni non esposti.** I campioni non esposti possono essere analizzati (i) prima dell'inizio dell'esposizione dei licheni nell'area di studio o (ii) alla fine della campagna di biomonitoraggio, insieme ai campioni esposti. Nel caso (i) i campioni non esposti devono essere preparati e analizzati secondo quanto riportato nei par. 4.5 e 4.6; nel caso (ii), i campioni non esposti dovranno essere conservati secondo quanto riportato nel par. 4.3.1 fino alla loro preparazione, che dovrà avvenire contestualmente a quella dei campioni esposti.
- **Campioni da esporre in campo.** Come specificato nel par 4.1.3 i campioni lichenici possono essere esposti tal quali (ancora attaccati al loro substrato naturale; rametti o corteccia) oppure mediante appositi espositori. In ogni caso, prima della loro esposizione/montaggio sugli espositori, i rametti e le cortecce coi talli devono essere ridotti a dimensioni adeguate in modo da garantirne il corretto assemblaggio su supporti di campo/espositori. I rametti e i frammenti di corteccia possono essere assicurati ai supporti di campo/espositori per mezzo di mastice vegetale, fascette in plastica o qualsiasi altro materiale adatto (Allegato C, Fig. C1-a - C1-g).
Nota. Una volta preparati, i campioni da esporre, montati o meno sugli espositori, devono essere adeguatamente imballati e sigillati in modo da evitare ogni tipo di contaminazione prima della loro esposizione, che dovrà comunque avvenire entro 2 settimane (in questo periodo i campioni dovranno essere mantenuti secchi a temperatura ambiente).

4.4 Installazione e recupero dei campioni

Durante le operazioni di esposizione e recupero dei campioni sul campo (area di studio), l'operatore dovrà registrare su un'apposita scheda di campo (Fig. D3, Allegato D) ogni informazione utile sulle condizioni di esposizione (p. es. potenziali cambiamenti rispetto a quanto notato durante i sopralluoghi preliminari).

- **Installazione.** Durante l'installazione dei campioni/espositori, l'operatore dovrebbe porre particolare attenzione nel replicare il più possibile l'orientamento naturale delle superfici del lichene, dal momento che questi organismi sono organizzati in modo dorsoventrale.
- **Recupero.** Dopo il periodo di esposizione, i campioni devono essere recuperati e riposti in buste di carta nuove recanti il codice identificativo delle UC.

4.5 Preparazione dei campioni analitici

Una volta in laboratorio, i campioni da analizzare verranno processati singolarmente selezionando e poi macinando le parti più esterne dei talli (Allegato B) al fine di incrementare l'omogeneità del materiale. Le porzioni selezionate comporranno i campioni da sottoporre ad analisi multi-elemento (par. 4.6.1).

4.5.1 Selezione del materiale lichenico idoneo

Le porzioni terminali selezionate dai talli devono essere prive di corpi fruttiferi, non infette da funghi lichenicoli o ricoperte da alghe epifite. La lunghezza delle porzioni terminali è specie-specifica e dipende dalla dimensione dei talli, dalla forma e dalla biomassa della specie selezionata (Allegato B). Le porzioni terminali devono essere selezionate mediante uno stereomicroscopio, con l'ausilio di pinzette in plastica o acciaio inox.

Questa operazione è particolarmente importante per la successiva determinazione della concentrazione degli elementi nel campione e deve pertanto essere effettuata con molta attenzione.

Nota. Anche in questa fase i campioni non devono essere lavati per evitare la perdita del particolato intrappolato sulla superficie del lichene e alterarne la composizione elementare.

4.5.2 Polverizzazione e omogeneizzazione dei campioni

Ogni campione deve essere polverizzato o tritato finemente (omogeneizzato). La polverizzazione può essere eseguita manualmente o tramite dispositivi di macinazione automatizzati (p. es. mulini a sfere; par. 2.3.3).

La polverizzazione manuale viene effettuata immergendo i campioni in c. 50 ml di azoto liquido e macinandoli in un mortaio di agata o ceramica.

L'uso di materiali di macinazione privi di contaminanti è di primaria importanza. Si dovrà altresì porre particolare attenzione nella pulizia di contenitori, mortai e strumentazione accessoria tra cicli successivi di macinazione.

Il materiale polverizzato dovrà essere riposto all'interno di appositi contenitori di laboratorio in plastica o vetro, non contaminati e sigillabili.

Nota. Dopo la polverizzazione, la massa dei campioni non deve essere inferiore a 200 mg.

4.5.3 Determinazione del peso secco

L'essiccazione dei campioni polverizzati ha il duplice scopo di proteggerlo dalla decomposizione microbica in caso di un loro successivo stoccaggio e di acquisire un valore di riferimento costante, in contrapposizione al peso fresco. I campioni polverizzati o tritati devono essere essiccati in forno a 105°C per almeno 7 ore per ottenere un contenuto di umidità di circa l'8% (Quevauviller et al., 1996). Limitatamente a elementi volatili come il mercurio, la determinazione del peso secco deve essere eseguita a temperature più basse al fine di prevenire la possibile perdita di specie volatili dell'elemento. In questo caso, l'essiccazione può essere effettuata a 40-50°C per 24 ore (Markert, 1995). Inoltre, nel caso in cui si sia interessati esclusivamente al mercurio, gli operatori devono considerare l'uso di sistemi di analisi dedicati come i Flow Injection Mercury Systems (Adamo et al., 2008) o la tecnica di combustione/trappola (p. es., i campioni solidi possono essere analizzati per combustione e successivo intrappolamento del mercurio su oro e analisi mediante spettroscopia di assorbimento atomico, senza necessità di mineralizzazione con acido liquido; Roos-Barraclough et al., 2002).

4.5.4 Conservazione dei campioni

I campioni polverizzati (d'ora in poi, 'campioni analitici' o 'campioni') devono essere conservati, assicurandosi che il metodo di conservazione e la durata non influenzino le concentrazioni elementari. I campioni analitici vengono in genere conservati in tubi di plastica o eppendorf e tenuti lontano da fonti di calore fino alla determinazione analitica.

Nota. Dopo lo stoccaggio a bassa temperatura, i campioni macinati devono essere scongelati in gel di silice per evitare la formazione di umidità. Nel caso di elementi volatili, si raccomanda di procedere il prima possibile con le analisi chimiche.

4.6 Procedure analitiche

4.6.1 Analisi chimiche

La determinazione analitica può essere effettuata mediante diverse tecniche. I laboratori incaricati dovranno essere accreditati per l'analisi di matrici vegetali, avere comprovata esperienza nel trattamento di matrici complesse e adottare appropriate misure per l'assicurazione della qualità delle procedure. Si suggerisce l'uso di un Materiale Standard di Riferimento (MSR, par. 2.2) specifico per matrici licheniche (p. es. BCR 482 "*Pseudevernia furfuracea*", IAEA-336 "*Evernia prunastri*"; Stone et al., 1995; Quevauviller et al., 1996; Schmeling et al., 2007).

4.6.2 Metodo di digestione

Qualora richiesto dalla tecnica analitica selezionata, i campioni polverizzati andranno mineralizzati tramite digestione acida prima della determinazione analitica. In particolare, si dovrà effettuare una digestione 'totale' con acido fluoridrico (p. es., HF/HNO₃/HCl: EN 13656; SW-846 EPA Metodo 3052), dal momento che questo acido forte assicura in genere un miglior recupero (ed una più elevata accuratezza analitica) per elementi presenti negli alluminosilicati e in altri minerali tipicamente resistenti ad attacchi acidi senza HF (Yafa & Farmer, 2006; Cecconi et al., 2019b).

4.7 Espressione dei risultati

I risultati di una campagna di biomonitoraggio sono i valori di concentrazione elementare misurati sia in campioni lichenici non esposti che in quelli esposti ed espressi in µg g⁻¹ DW. Il contenuto elementare dei campioni dev'essere riportato sotto forma di dato grezzo, ovvero, $n \geq 3$ valori di concentrazione per i campioni esposti in una UC ed $m > n$ valori di concentrazione per i campioni non esposti (Fig. 4.1.4; Fig. 4.2). Oltre al dato grezzo, si devono riportare anche i valori medi e le incertezze associate (Fig. 4.2).

Per valutare l'arricchimento elementare nella singola UC, e a scopo interpretativo (par. 4.8), i valori medi di concentrazione misurati nei campioni esposti (*Exposed*, E) devono essere espressi rispetto a quelli osservati nei campioni non esposti (*Unexposed*, U), in termini del cosiddetto *Exposed-to-Unexposed* ratio (*EU ratio*, formula 4.1; Cecconi et al., 2019a).

Per la i -esima UC ($i = 1, \dots, N$) e un generico elemento y , per il quale sono disponibili n misure per campioni esposti ($j = 1, \dots, n$) ed $m > n$ misure per campioni non esposti ($j = 1, \dots, m$), il valor medio di *EU ratio* è dato da:

$$EU^{(i)} = \frac{y_E^{(i)}}{y_U} \quad (4.1)$$

$y_E^{(i)} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n y_{Ej}^{(i)}$: media degli n valori di concentrazione misurati nei campioni esposti nella i -esima UC ($n \geq 3$);

$y_U = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m y_{Uj}$: media degli m valori di concentrazione misurati nei campioni non esposti raccolti in un'area di background consolidata ($m > n$).

4.8 Interpretazione dei risultati

Al fine di valutare la severità dei fenomeni di inquinamento in un'area di studio, i risultati del

biomonitoraggio devono essere soggetti ad adeguata trattazione statistica. Inoltre gli *EU ratio* (par. 2.2 e 4.7) devono essere interpretati per mezzo di strumenti interpretativi ad hoc.

4.8.1 Analisi statistiche basilari per dati di biomonitoraggio

I risultati di una campagna di biomonitoraggio (sia espressi in termini di concentrazione elementare media o di *EU ratio* in ciascuna UC, formula 4.1) possono essere analizzati per mezzo di statistiche univariate e multivariate e modelli non parametrici (Brunialti & Frati, 2007). I dati, in forma di matrici di concentrazione elementare nelle UC, sono generalmente analizzati tramite tecniche statistiche di uso consolidato per l'identificazione di sorgenti emmissive, quali analisi di correlazione, analisi dei gruppi (*Cluster Analysis*) e delle componenti principali (*Principal Component Analysis*) (Bargagli & Mikhailova, 2002). I dati di bioaccumulo possono inoltre essere rappresentati tramite mappe bidimensionali utilizzando appositi software (Allegato H).

Gli strumenti statistici e le procedure di *mapping* dovrebbero consentire l'identificazione di (i) pattern spaziali di contenuto elementare nei campioni lichenici, (ii) trend temporali di contenuto elementare nel caso di campagne ripetute e (iii) contaminazione terrigena dei campioni dovuta a fenomeni di risospensione del particolato legato al suolo.

Nota. La contaminazione terrigena può puntualmente essere messa in evidenza tramite il cosiddetto fattore di arricchimento (*Enrichment Factor*, EF), che confronta la concentrazione di un analita accumulato nei campioni lichenici con quella in campioni di suolo (Bargagli & Mikhailova, 2002). In questo caso il campionamento del suolo dovrà seguire linee guida specifiche (p. es. Icp-forests.net) e i campioni lichenici dovranno essere analizzati con la medesima tecnica analitica utilizzata per i licheni.

4.8.2 Strumento interpretativo: la scala di bioaccumulo per i trapianti lichenici

Una scala interpretativa è uno strumento fondamentale per interpretare adeguatamente la severità dei fenomeni di inquinamento. Una 'Scala di Bioaccumulo' per risultati di biomonitoraggio tramite trapianti lichenici è fornita in Cecconi et al. (2019a) ed è qui riportata in Tabella 4.1. La scala si basa sull'analisi della distribuzione di centinaia di record di *EU ratio* raccolti dalla letteratura e consta di cinque classi corrispondenti a livelli crescenti di bioaccumulo in campioni di licheni trapiantati. I limiti inferiori e superiori delle classi si riferiscono ai valori corrispondenti al 25°, 75°, 90° e 95° percentile della distribuzione di *EU ratio* (per dettagli si veda Cecconi et al., 2019a).

Tabella 4.1 – Scala di bioaccumulo per i trapianti lichenici.

Scala di bioaccumulo con classi, descrizioni, soglie percentile e corrispondenti valori di *EU ratio* per tre diverse durate di esposizione (4, 8 e 12 settimane), nonché i codici RGB e HTML per i colori da associare alle diverse classi di bioaccumulo.

Classe di bioaccumulo		Soglie percentili	<i>EU ratio</i>			Codice del colore	
ID	Descrizione		4 settimane	8 settimane	12 settimane	RGB	HTML
1	Assenza di bioaccumulo	$\leq 25^{\text{th}}$	≤ 1.0	≤ 1.0	≤ 1.0	0, 0, 255	#0000FF
2	Bioaccumulo basso	$(25^{\text{th}}, 75^{\text{th}}]$	(1.0, 1.8]	(1.0, 1.9]	(1.0, 1.8]	0, 128, 0	#008000
3	Bioaccumulo moderato	$(75^{\text{th}}, 90^{\text{th}}]$	(1.8, 2.5]	(1.8, 2.7]	(1.9, 3.1]	255, 243, 15	#FFF30F
4	Bioaccumulo elevato	$(90^{\text{th}}, 95^{\text{th}}]$	(2.5, 2.8]	(2.7, 3.5]	(3.1, 3.7]	255, 0, 0	#FF0000
5	Bioaccumulo severo	$> 95^{\text{th}}$	> 2.8	> 3.5	> 3.7	128, 0, 64	#800040

4.8.3 Attribuzione della classe di bioaccumulo all'Unità di Campionamento

L'attribuzione della classe di bioaccumulo (Tabella 4.1) ad una UC dev'essere effettuata sulla base del valore medio di *EU ratio* (formula 4.1, par. 4.7) diminuito della sua incertezza $\Delta(EU^{(i)})$. Quindi, per la *i*-esima UC, la corrispondente classe di bioaccumulo è determinata in base al valore assunto da $EU^{(i)} - \Delta(EU^{(i)})$ (Fig. 4.1), dove $\Delta(EU^{(i)})$ è ottenuta propagando l'incertezza associata a $y_E^{(i)}$ e y_U (si veda il par. 4.7 per le definizioni).

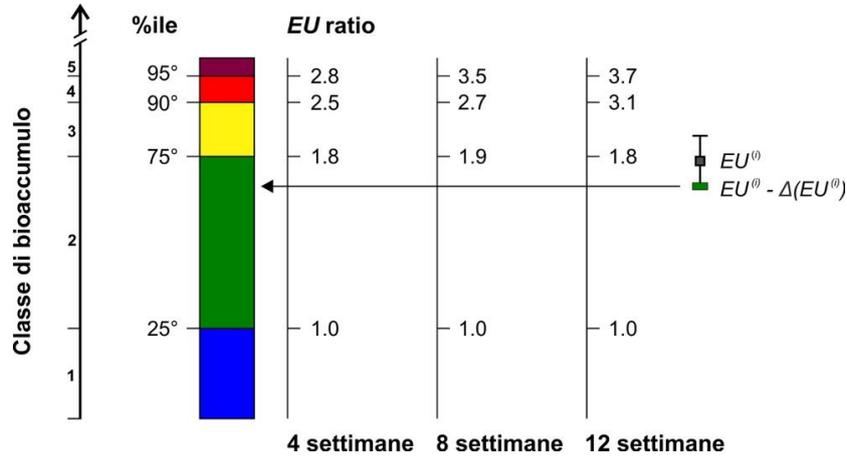


Figura 4.1 – Modalità di attribuzione della classe di bioaccumulo ad una UC.

Soglie percentile e corrispondenti valori di EU ratio della scala di bioaccumulo per i trapianti lichenici; i dati sono riportati separatamente per tre diverse durate di esposizione (4, 8 e 12 settimane).

Per poter calcolare $\Delta(EU^{(i)})$, l'operatore deve conoscere: (i) l'incertezza associata al valore di concentrazione elementare medio nei campioni esposti nella i -esima UC ($\Delta(y_E^{(i)})$) e (ii) l'incertezza associata al valore di concentrazione elementare medio nei campioni non esposti ($\Delta(y_U)$). Tali incertezze possono essere calcolate assumendo una distribuzione triangolare per i dati di concentrazione elementare, dal momento che tale distribuzione è ampiamente utilizzata in ecologia per calcolare l'incertezza di misura in caso di limitata numerosità campionaria (Physics.nist.gov). In particolare, tali incertezze si ottengono calcolando la differenza tra il valore di concentrazione massimo e minimo e dividendo tale differenza per $\sqrt{6}$ (formule 4.2 e 4.3, con fattore di copertura $k = 2$, che garantisce limiti fiduciali al 95%).

$$\Delta(y_E^{(i)}) = k \left(\frac{\max\{y_{Ej}^{(i)}\} - \min\{y_{Ej}^{(i)}\}}{2\sqrt{6}} \right) = \frac{\max\{y_{Ej}^{(i)}\} - \min\{y_{Ej}^{(i)}\}}{\sqrt{6}} \quad (4.2)$$

$\max\{y_{Ej}^{(i)}\}$: massimo tra gli n valori di concentrazione misurati nei campioni esposti nella i -esima UC;

$\min\{y_{Ej}^{(i)}\}$: minimo tra gli n valori di concentrazione misurati nei campioni esposti nella i -esima UC.

$$\Delta(y_U) = k \left(\frac{\max\{y_{Uj}\} - \min\{y_{Uj}\}}{2\sqrt{6}} \right) = \frac{\max\{y_{Uj}\} - \min\{y_{Uj}\}}{\sqrt{6}} \quad (4.3)$$

$\max\{y_{Uj}\}$: massimo tra gli m valori di concentrazione misurati nei campioni non esposti;

$\min\{y_{Uj}\}$: minimo tra gli m valori di concentrazione misurati nei campioni non esposti.

Infine, $\Delta(EU^{(i)})$ può essere facilmente calcolato in base alla formula 4.4.

$$\Delta(EU^{(i)}) = EU^{(i)} \sqrt{\left(\frac{\Delta(y_E^{(i)})}{y_E^{(i)}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta(y_U)}{y_U} \right)^2} \quad (4.4)$$

Esempio numerico

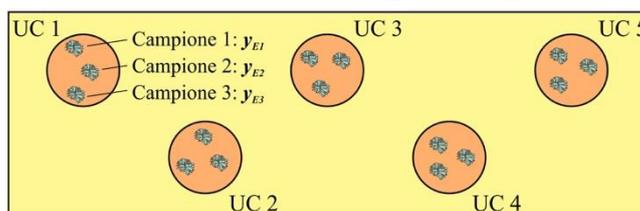
Si supponga di voler valutare il livello di bioaccumulo di cromo (Cr) in campioni di *Pseudevernia furfuracea* esposti in $N = 5$ UC in un'area di studio, avendo $n = 3$ campioni esposti per 12 settimane in ciascuna UC ed $m = 6$ campioni non esposti (Fig. 4.2). A scopo di generalizzazione, le concentrazioni medie di Cr nelle UC e i valori medi nei campioni non esposti saranno indicati rispettivamente come y_E e y_U (Fig. 4.2).

Area di background



Campione	Concentrazione ($\mu\text{g g}^{-1}$)
y_{U1}	1.46
y_{U2}	1.32
y_{U3}	1.35
y_{U4}	1.24
y_{U5}	0.86
y_{U6}	0.82
y_U	1.18
$\Delta(y_U)$	0.26

Area di studio



UC	y_{E1} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y_{E2} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y_{E3} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	y_E ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$\Delta(y_E)$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	1.67	1.90	0.94	1.50	0.39
2	5.50	4.98	4.72	5.07	0.32
3	3.50	3.10	3.10	3.23	0.16
4	4.00	4.00	3.05	3.68	0.39
5	1.80	1.60	1.65	1.68	0.08

Figura 4.2 – Esempio numerico: dati iniziali.

Valori di concentrazione per l'elemento Cr misurati in $m = 6$ campioni non esposti (y_{Uj}), il loro valor medio e l'incertezza associata (y_U e $\Delta(y_U)$), nonché i valori di Cr misurati in $n = 3$ campioni esposti in ciascuna delle $N = 5$ UC (y_{Ej}), i loro valori medi e le incertezze associate (y_E e $\Delta(y_E^{(i)})$).

Dal dataset esemplificativo in Fig. 4.2, l'applicazione delle formule 4.1 - 4.4 consente facilmente di calcolare la media di *EU ratio*, l'incertezza associata e la loro differenza ($EU - \Delta(EU)$), permettendo perciò l'attribuzione di una classe della scala di bioaccumulo alle UC (Tabella 4.2; Fig. 4.3).

UC	<i>EU</i>	$\Delta(EU)$	$EU - \Delta(EU)$	Classe
1	1.27	0.43	0.84	1
2	4.29	0.98	3.31	4
3	2.74	0.62	2.12	3
4	3.12	0.76	2.36	3
5	1.43	0.32	1.10	2

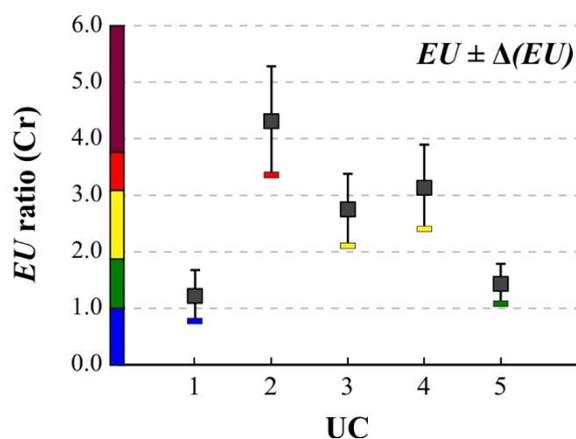


Figura 4.3 – Esempio numerico: output finale

EU ratio e incertezze associate per l'elemento Cr nelle 5 UC. Si riporta anche la loro differenza, utilizzata per la determinazione della classe di ciascuna UC, unitamente ad una rappresentazione grafica dell'output.

5. RACCOMANDAZIONI PER L'ASSICURAZIONE E IL CONTROLLO DI QUALITÀ

Per controllare gli errori e documentare nel complesso la qualità della campagna di indagine/monitoraggio, dovrebbero essere contemplate appropriate Procedure di Assicurazione di Qualità (QA) e Controllo di Qualità (QC) (si vedano Cline & Burkman, 1989; Shampine, 1993; US EPA, 2002). Queste procedure costituiscono parte integrante della progettazione e dei risultati dello studio (si vedano per esempio McCune et al., 1997; Brunialti et al., 2002; Brunialti et al., 2004; Giordani et al., 2009). Gli studi che non riportano le procedure di QA e i risultati di QC (con particolare riferimento ai punti (i) e (ii) riportati di seguito) devono essere considerati incompleti.

Le procedure QA e QC dovranno essere descritte in un documento *ad hoc* dello studio, denominato Piano di Assicurazione di Qualità (QAP), che dovrebbe comprendere l'insieme minimo accettabile di procedure QA/QC da prendere in considerazione. Un esempio di informazioni necessarie alla fine dell'indagine è riportato nell'Allegato E. Il QAP dovrebbe includere i seguenti aspetti:

- i. Gestione del Progetto. Rappresenta una descrizione dell'organizzazione e della gestione dello studio e le sue esigenze. Questo documento dovrebbe includere:
 - L'identificazione delle responsabilità. Le persone responsabili del progetto dovrebbero essere chiaramente identificate, insieme al proprio ruolo e alle proprie responsabilità, sia dal committente che dall'organizzazione incaricata di condurre lo studio.
 - La descrizione dell'obiettivo dello studio, del problema considerato e dell'utilizzo finale delle informazioni dello studio.
 - L'obiettivo del campionamento dello studio.
 - Gli Obiettivi di Qualità dei Dati (DQO), vale a dire, le dichiarazioni qualitative e quantitative che chiariscono gli obiettivi tecnici e di qualità dello studio. Essi possono variare a seconda del tipo di studio: definiscono il tipo appropriato di dati e specificano i livelli tollerabili di potenziali errori decisionali che saranno utilizzati come base per stabilire la qualità e la quantità di dati necessari a supporto delle decisioni.
 - Gli Indicatori di Qualità dei Dati (DQI): le statistiche quantitative e i descrittori qualitativi utilizzati per interpretare il grado di accettabilità o utilità dei dati. Possono essere considerati due indicatori: gli Obiettivi di Qualità della Misura (MQO), definiti come il livello atteso di accuratezza dei dati (es. percentuali medie di recupero calcolate come il rapporto percentuale tra la misura e il valore atteso per il Materiale di Riferimento Standard) e i limiti di Qualità dei Dati (DQL), definiti come il livello minimo accettabile di coerenza tra i dati di controllo e i dati dell'operatore.
 - Le esigenze in termini di formazione e competenza del personale coinvolto e di qualsiasi certificazione e licenza richiesta.
 - I permessi necessari per accedere alle aree private o aree con accesso limitato.
- ii. Procedure Operative Standard (SOP). Le SOP dovrebbero essere coerenti con le presenti linee guida e devono fornire i dettagli relativi all'adattamento necessario per le condizioni peculiari dell'area di studio. Se necessario, le SOP devono essere annesse al QAP come documento separato. Le SOP dovrebbero essere firmate dalle persone responsabili (vedi il primo punto dell'elenco del punto (i)) e esplicitamente accettate dal personale coinvolto. Le SOP dovrebbero includere:
 - La descrizione del metodo di campionamento adottato e la sua giustificazione in relazione all'obiettivo dello studio, inclusi la descrizione dell'attrezzatura e delle schede di campo.
 - La descrizione del metodo utilizzato per localizzare, sulla mappa e in campo, i siti di campionamento.
 - La descrizione dei metodi usati in campo per la raccolta dei dati e dei campioni di licheni.
 - La descrizione delle fasi di stoccaggio dei campioni raccolti.
 - La descrizione del metodo di trapianto adottato (per il metodo dei trapianti di licheni).
 - La descrizione delle fasi di custodia dei dati (raccolta in campo, archiviazione in formato elettronico, trasmissione all'eventuale database centrale).
 - La descrizione del software e dell'hardware da utilizzare nelle diverse fasi dello studio.
- iii. Controllo di Qualità dei Dati (QC). Dovrebbe essere descritto qui l'insieme delle attività atte ad assicurare il raggiungimento dei DQO e DQI. QC potrebbe includere:
 - L'identificazione dei requisiti del personale coinvolto nelle indagini. La certificazione della squadra di rilevatori potrebbe considerare l'errore dell'osservatore in ogni fase del campionamento.

-
- La selezione dei siti e degli alberi in campo (per il metodo dei licheni nativi).
 - La determinazione delle specie arboree (per il metodo dei licheni nativi).
 - L'identificazione tassonomica delle specie licheniche adatte.
 - La raccolta e l'imballaggio dei campioni.
 - L'esposizione in campo dei campioni (per il metodo dei trapianti di licheni).
 - La pulizia e l'omogeneizzazione dei campioni.
 - La conservazione dei campioni.
 - Le procedure di formazione del personale. Descrizione di procedure adottate per formare il personale sui contenuti delle SOP.
 - La calibrazione del personale. Descrizione degli esercizi da condurre per promuovere la calibrazione fra gli operatori coinvolti.
 - La descrizione dei criteri e delle procedure da adottare per accettare, rifiutare o validare le informazioni dello studio.

ALLEGATO A. Diagramma di flusso delle fasi principali standard

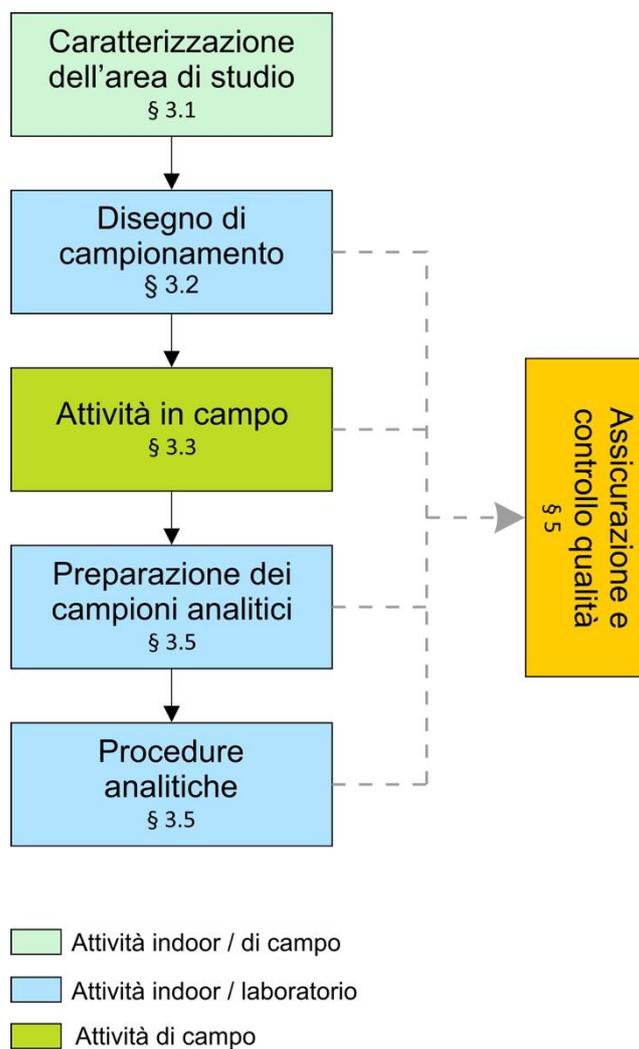


Figura A1 - Diagramma di flusso delle fasi di uno studio di biomonitoraggio mediante licheni nativi ^N.

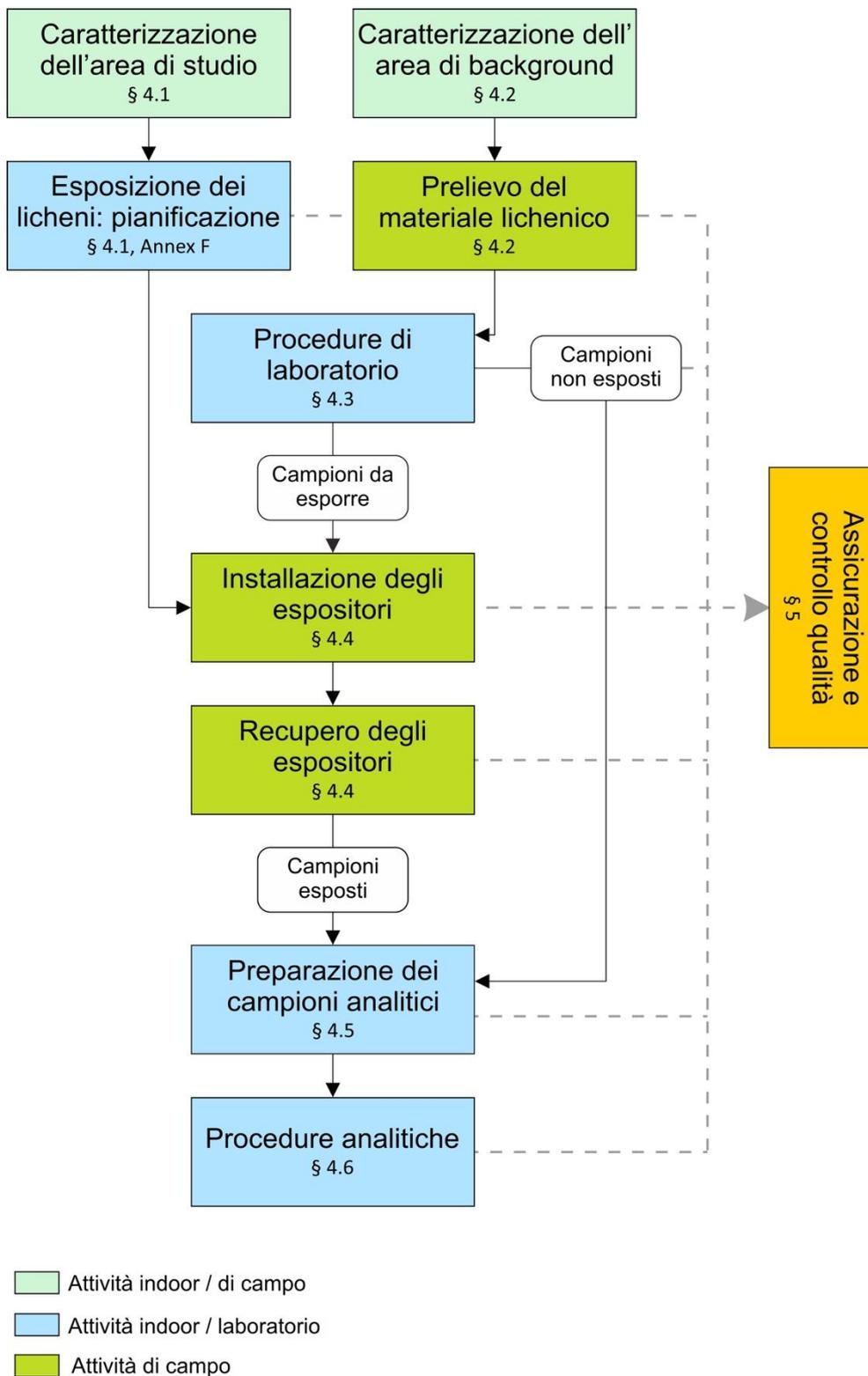


Figura A2 - Diagramma di flusso delle fasi di uno studio di biomonitoraggio mediante trapianti lichenici ^T.

ALLEGATO B. Consigli per l'identificazione delle specie licheniche idonee

I caratteri rilevanti per poter identificare i licheni sono la forma di crescita, i diversi tipi di strutture propagative e riproduttive, le strutture superficiali e il colore del tallo, nonché i risultati di semplici test chimici. A seguire si riportano un elenco dei test chimici e schede descrittive con le principali caratteristiche morfologiche ed ecologiche delle specie licheniche idonee per lo svolgimento di studi di bioaccumulo.

Caratteristiche chimiche dei licheni

I licheni producono numerosi metaboliti secondari, alcuni dei quali efficacemente usati come caratteri diacritici. I test chimici sono un modo veloce e non oneroso di esaminare le sostanze licheniche. Infatti, alcuni di questi composti reagiscono tipicamente con determinate sostanze dando reazioni cromatiche utili all'identificazione delle specie. Alcune reazioni sono deboli e poco persistenti per cui occorre verificarle allo stereomicroscopio, osservando l'alterazione cromatica di un disco di carta assorbente posto a contatto con la porzione di tallo coinvolta nella reazione. Per effettuare test chimici efficaci, occorre utilizzare soluzioni di recente preparazione su talli secchi. I test più comuni, sono:

- **K (idrossido di potassio).** Molte identificazioni dipendono dalla reazione del tallo al potassio (K) in forma di una soluzione di soda caustica (idrossido di sodio) e acqua (10% e 90% in volume, rispettivamente).
Reazione positiva (K+): giallo, arancione o rosso.
- **C (ipoclorito di sodio).** La soluzione C si ottiene da ipoclorito di sodio (candeggina) e acqua (50% ciascuno in volume). La soluzione deve essere fresca perché si deteriora velocemente. La reazione può essere fugace o poco intensa, quindi è essenziale eseguire il test osservando attentamente l'alterazione allo stereomicroscopio. Nell'utilizzo di candeggine domestiche, occorre verificarne la composizione poiché possono contenere potassio o altri ioni in grado di dare false reazioni positive.
Reazione positiva (C+): rosa, arancione o rosso, molto raramente verde.
- **KC.** In questo test, idrossido di potassio (K) e ipoclorito di sodio (C) devono essere utilizzati in sequenza. Occorre quindi applicare prima K, assorbire l'eccesso con carta assorbente, e quindi, subito dopo, applicare il C sulla stessa porzione di tallo.
Reazione positiva (KC+): rosso rosato, raramente viola.
- **Pd (para-fenilendiammina).** Il Pd si ottiene sciogliendo alcuni cristalli di para-fenilendiammina in alcool etilico al 90% e utilizzandolo al momento perché è un reattivo che si deteriora in poche ore. Poiché la para-fenilendiammina è un allergene ed è tossica per inalazione e contatto con la pelle, la soluzione in etanolo va maneggiata con molta attenzione. Una preparazione alternativa, più stabile e sicura da utilizzare, si ottiene sciogliendo 1 g di para-fenilendiammina, 10 g di solfito di sodio e 0,5 ml di detergente in 100 ml di acqua (soluzione di Steiner).
Reazione positiva (Pd+): giallo, arancione o rosso.

Per maggiori informazioni sulle caratteristiche chimiche dei licheni fare riferimento a:

- <http://www.britishlichensociety.org>
- Orange et al., 2001.
- Baruffo et al., 2001.

Per dettagli relativi all'identificazione dei taxa lichenici fare riferimento a:

- Nimis, 2016.
- Nimis & Martellos, 2017.
- Smith et al., 2009.

Descrizione delle specie idonee in ordine alfabetico

Evernia prunastri

Nome: *Evernia prunastri* (L.) Ach.

Forma di crescita: fruticosa.

Substrato: corteccia (alberi con scorza con pH da neutro ad acido).

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite soredi.

Distribuzione: lichene a distribuzione olartica, diffuso e abbondante, con un'ampia tolleranza ecologica, raro solo in situazioni disturbate e in habitat aridi.

Breve descrizione: tallo (1-)2-6(-10) cm di lunghezza, 2-4(-6) cm di larghezza, circa 1 mm di spessore, fruticoso, morbido, palmato con numerose lacinie nastriformi spesso contorte e pendenti; la superficie superiore ha un colore da verde-grigio a giallo-verde pallido, presenta spesso una reticolatura incompleta di creste e avvallamenti che si espandono verso i margini dei lobi; diversamente da quella superiore, la superficie inferiore è biancastra, con macchie verdastre soprattutto verso le estremità delle lacinie; i sorali sono marginali e/o laminali, inizialmente arrotondati e spesso confinati alle superfici erose delle creste e/o ai margini dei lobi, diventando successivamente confluenti, presentano un colore più chiaro o simile a quello della superficie superiore. Gli apotecii hanno un diametro di 2-5 mm.

I talli di *E. prunastri* in condizioni d'ombra di solito si presentano meno ramificati, più chiari e spesso più allungati. I campioni provenienti da siti inquinati hanno dimensioni ridotte con lobi contorti o rovesciati che possono essere marcatamente erosi e sorediati. *Evernia prunastri* può essere confusa con *Ramalina farinacea* che si differenzia non avendo il classico aspetto dorsiventrale.

Medulla C-, K-, KC-, Pd-.

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 10 - 20 mm.



Figura B1 – *Evernia prunastri* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Flavoparmelia caperata

Nome: *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.

Forma di crescita: fogliosa a lobi larghi.

Substrato: corteccia di alberi decidui isolati; più raramente su alberi sempreverdi e solo eccezionalmente su rocce.

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite soredi.

Distribuzione: una specie pantemperata, comune e abbondante nella fascia submediterranea, soprattutto del versante tirrenico della Penisola, più rara altrove. In aree umide è comune anche nell'ambito della vegetazione mediterranea mentre in aree secche è ristretta ad ambienti ombrosi, ad esempio all'interno dei boschi. Specie temperata, diffusa in tutta Italia al di sotto della fascia montana.

Breve descrizione: tallo ampio fino a 20 cm, spesso in forma di estese coperture ± strettamente appressate al substrato, in modo più lasso verso il centro; i lobi sono larghi 5-13 mm, ondulati, arrotondati agli apici, ± contigui alle estremità ma sovrapposti al centro; i margini spesso incisi; la superficie superiore ha un colore verde acqua, a volte grigio-verde (in ombra), è spesso grossolanamente rugosa, soprattutto verso il centro, pustulato-sorediato; le pustule sono laminali, inizialmente puntiformi e intatte, alla fine coalescenti per formare aree erose estese; i soredi sono grossolani e granulari, occasionalmente aderiscono formando grumi nodosi; la superficie inferiore è nera, marrone verso i margini dei lobi; le rizine sono presenti fino a ca. 1 cm dal margine del tallo. Gli apoteci sono rari e raggiungono 8 mm di diametro. Talvolta la specie può essere confusa con la relativamente comune *Flavoparmelia sorediens* e la più rara *Flavopunctelia flaventior*.
Cortex K-, medulla C-, K± giallo sporco, KC± rosso, Pd+ arancio-rosso.

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 2 - 5 mm.

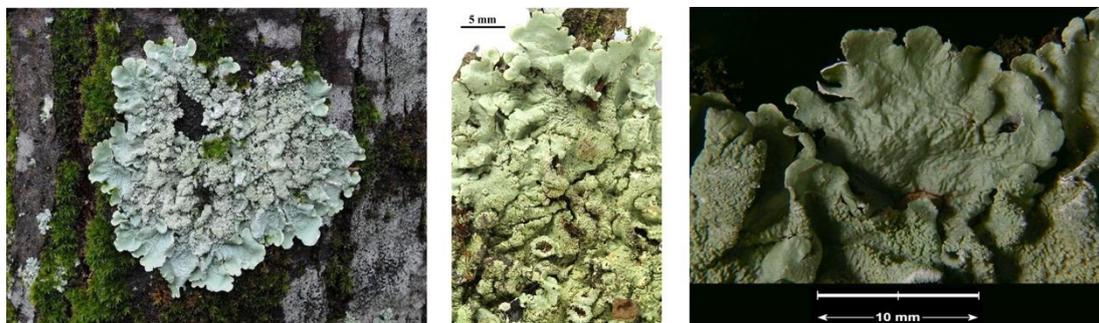


Figura B2 – *Flavoparmelia caperata* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Hypogymnia physodes

Nome: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

Forma di crescita: fogliosa a lobi stretti.

Substrati: corteccia o legno di latifoglie decidue e conifere, raramente su roccia, muschio o suolo.

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite soredi.

Distribuzione: specie circumpolare, artico-mediterranea, montana, che si ritrova dalla fascia planiziale a quella subalpina.

Breve descrizione: tallo fino a 10 cm di diametro, \pm lassamente adeso al substrato, può formare rosette o diffondersi in modo irregolare; i lobi sono larghi 2-3 mm, \pm cavi all'interno, spesso ascendenti verso i margini; la superficie superiore è grigia, liscia \pm brillante, sorediata; i sorali sono labriformi, si sviluppano dalla rottura dei margini inferiori dei lobi che assumono una forma "a ventaglio"; la superficie inferiore è rugosa, nera, diventa marrone pallido verso i margini. Gli apotecii sono piuttosto rari, con base spessa e disco rosso-marrone. *Hypogymnia physodes* è una specie polimorfa, può presentarsi con talli dall'aspetto contorto e simil fruticosi o più strettamente adesi al substrato, con lobi sovrapposti e rigonfi o con talli sottili con ramificazioni digitiformi e lobi discreti. Talvolta la specie può essere confusa con forme scarsamente sviluppate di *H. tubulosa*, che ha sorali capitiformi.

Cortex K+ giallo; medulla e sorali C-, K-, KC+ rosso, Pd+ arancione a rosso.

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 2 - 5 mm.



Figura B3 – *Hypogymnia physodes* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Parmelia sulcata

Nome: *Parmelia sulcata* Taylor s.lat.

Forma di crescita: fogliosa a lobi larghi.

Substrato: corteccia acida o subacida e rocce silicee, eccezionalmente su legno.

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite soredi.

Distribuzione: specie pantemperata e sud-boreale, diffusa dalle regioni costiere sino alle sommità montane più esposte. Cosmopolita, è una tra le specie licheniche con la distribuzione più ampia.

Breve descrizione: Tallo con diametro di 5-10(-20) cm, spesso a forma di rosette complete o casualmente sovrapposte, \pm debolmente aderenti al substrato, con lobi larghi fino a 5 mm, apici incisi, discreti o contigui e sovrapposti, specialmente al centro del tallo; superficie superiore da grigio-bianco a grigio-verde, a volte bianco-pruinosa, piatta a debolmente corrosa, con pseudocifelle bianche, ovali o allungate, sparse che tendono a fondersi per formare una rete cospicua, grossolana, incompleta; soriali allungati, laminali e marginali, derivanti dalla rottura del cortex in corrispondenza delle pseudocifelle; soredi granulari; superficie inferiore nera, marrone verso il margine; rizine semplici o biforcute. Apoteci occasionali con disco da rosso-marrone a marrone scuro.

Parmelia sulcata s.lat. varia in modo considerevole nella dimensione e nel grado di separazione dei lobi, oltre che nella quantità di soriali prodotti. *Parmelia saxatilis* si differenzia da *P. sulcata* per la presenza di isidi, mentre *P. submontana* per i lobi ad andamento geotropico e la presenza di soriali da granulari a isidioidi.

Cortex K+ giallo che vira al rosso; medulla e soriali C-, K+ arancione, KC+ arancione, Pd+ arancione.

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 2 - 5 mm.



Figura B4 – *Parmelia sulcata* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Pseudevernia furfuracea

Nome: *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf.

Forma di crescita: da fogliosa a lobi ampi a fruticosa.

Substrato: su scorza o su legno esposti e ben illuminati, su conifere e soprattutto su alberi decidui a scorza acida, più raramente su rocce silicee.

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite isidi o strutture simili ad isidi, sebbene gli apoteci siano abbastanza frequenti nelle popolazioni subalpine.

Distribuzione: Specie da temperato-fredda a boreale-montana con optimum nelle fasce montana e subalpina; abbondante nelle Alpi, più rara negli Appennini, al nord raggiunge eccezionalmente la pianura su substrati molto acidi.

Breve descrizione: i talli raggiungono 10 cm di lunghezza, sono composti da lobi di numero variabile, pendenti, larghi da 1 a 4 mm, ramificati dicotomicamente su un piano, ramificati con rami laterali corti e molto divergenti; la superficie superiore è grigio-bianca, opaca, spesso ruvida con isidi o formazioni simili; la superficie inferiore è solitamente canalizzata, di colore grigio-nero o screziato di nero e bianco-brunastro o rosato, con margini incurvati dello stesso colore della superficie superiore. Gli apoteci raggiungono 1,5(-3) cm di diametro, si sviluppano lateralmente sulle parti ricurve delle ramificazioni.

Pseudevernia furfuracea somiglia a *Evernia prunastri* ma è caratterizzata dalla presenza di isidi e di una superficie inferiore canalizzata, almeno parzialmente annerita, mentre *E. prunastri* è solo debolmente dorsiventrale, con una superficie superiore verdastra, medulla lassa, e una superficie inferiore bianca.

Cortex K+ giallo; medulla Pd-, C- (*Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*) or C+ da rosa a rosso (*Pseudevernia furfuracea* var. *ceratea*).

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 15 - 25 mm (p. es., Incerti et al., 2017).



Figura B5 – *Pseudevernia furfuracea* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Ramalina farinacea

Nome: *Ramalina farinacea* (L.) Ach.

Forma di crescita: fruticosa.

Substrato: di solito su scorza, molto raramente su roccia.

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente vegetativa tramite soredi.

Distribuzione: si tratta di un lichene diffuso, con distribuzione da mediterraneo-atlantica a sud boreale, che colonizza la corteccia in situazioni umide, dalle montagne alla fascia mediterranea; estinto in gran parte delle pianure settentrionali, appare ancora comune nelle aree montane.

Breve descrizione: tallo 3-6(-10) cm di lunghezza, a forma di cespuglio, pendente, aderente in un unico punto al substrato da cui si originano ramificazioni piatte con larghezza fino a 3 mm, di colore da verde giallastro a verde grigiastro. La medulla è compatta, il subcortex di consistenza cartilaginea; i sorali sono numerosi, marginali, discreti, da circolari a ellissoidali; i soredi sono farinosi, hanno un diametro di 20-30 μm e un colore giallo-verde pallido. Apoteci rari, laterali.

Ramalina farinacea è chimicamente e morfologicamente molto polimorfa: può somigliare a *Evernia prunastri* ma ha un tallo compatto e cartilagineo, ed è concolore su entrambi le superfici del tallo.

Diversi chemotipi: (1) medulla e sorali K- o arancione-marrone, Pd+ arancione-rosso (2) K+ giallo-rosso, Pd+ giallo-arancione (3) K-, Pd-.

Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 15 - 25 mm.



Figura B6 – *Ramalina farinacea* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0).

Xanthoria parietina

Nome: *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.

Forma di crescita: fogliosa a lobi larghi.

Substrato: su un'ampia varietà di substrati ricchi e arricchiti di nutrienti, tra cui corteccia d'albero e rocce (alberi lungo la strada, rocce calcaree interne o costiere o rocce silicee basiche, tegole dei tetti, recinzioni di legno o di fattorie).

Fotobionte: alghe verdi (*Trebouxia* spp.).

Strategia riproduttiva: prevalentemente sessuale.

Distribuzione: cosmopolita.

Breve descrizione: tallo esteso fino a 15 cm di diametro, spesso forma ampie colonizzazioni attraverso rosette regolari, gialle-arancioni, ma frequentemente \pm grigie, appressate, rugose; i lobi sono \pm sovrapposti, plicati, più ampi verso gli apici, con apici incisi, di 1-3 mm di ampiezza, arrotondati o leggermente dentellati e \pm piatti; possono essere presenti nel centro della rosetta, lobuli sparsi, grossolani, piatti, da subsquamulosi a ligulati che a volte diventano abbondanti; il tallo aderisce al substrato tramite apteri. Presenta numerosi apoteci, di dimensioni fino a 4 mm di diametro, da sparsi a raggruppati, da sessili ad apparentemente pedunculati, in particolare sui ramoscelli, da orbicolari a contorti, concavi all'inizio dello sviluppo, piatti a maturità, con excipolo leggermente sollevato, liscio, dello stesso colore del tallo; gli apoteci più maturi sui vecchi talli diventano convessi e immarginati.

Si tratta di un lichene comune e abbondante, di solito facilmente riconoscibile dal tallo a rosetta e di colore uniformemente giallo-arancione con abbondanti apoteci di varia età. I talli verdi, con una quantità di parietina (pigmento giallo) notevolmente ridotta, si trovano in habitat ombreggiati. Le forme con lobuli a volte sono difficili da distinguere da *X. calcicola* (per lo più sassicola) e da *X. aureola*.

Tallo K⁺rosso.

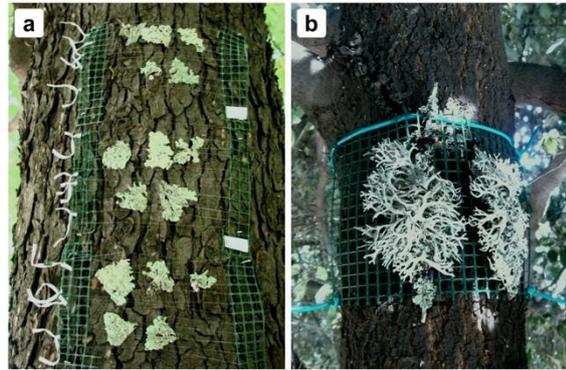
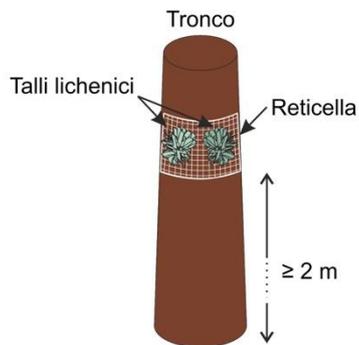
Lunghezza delle parti terminali dei talli da selezionare: 2 - 4 mm (si veda Fortuna & Tretiach, 2018).



Figura B7 – *Xanthoria parietina* (immagini: <http://dryades.units.it/italic>, CC BY-SA3.0)

ALLEGATO C. Esempi di trapianto ed espositori ^T

Tronchi



Rami

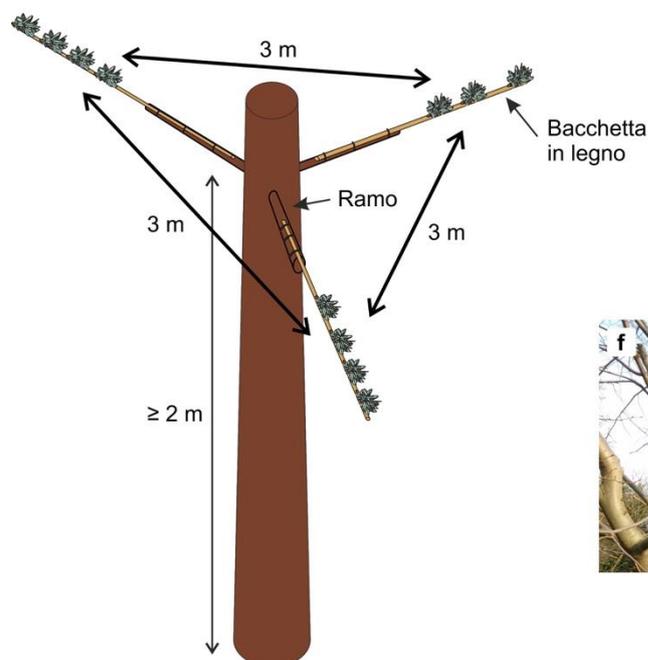
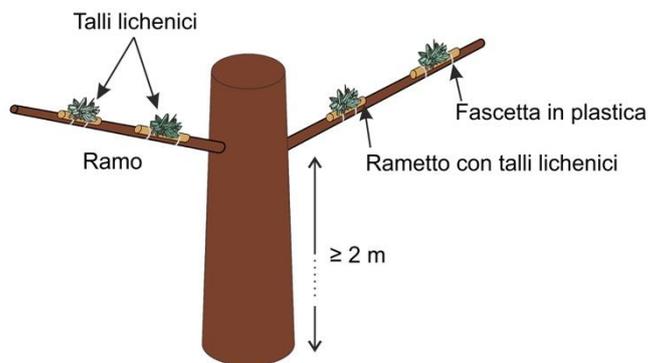


Figura C1 – Esempi di trapianto.

Rappresentazioni schematiche e foto di campioni lichenici trapiantati su tronchi o rami di alberi. Porzioni di talli di *Flavoparmelia caperata* su espositore (reticella) adeso a un tronco (a); talli di *Pseudevernia furfuracea* su espositore (reticella) adeso a un tronco (b); talli di *Evernia prunastri* su un ramo (c); talli di *Ramalina canariensis* su un ramo (d); talli di *P. furfuracea* su espositori (bacchette in legno: c. 0,5 cm diam. e 120 cm di lunghezza; Kodnik et al., 2015) a loro volta assicurati a rami (la distanza tra i tre espositori è di c. 3 m) (e); dettaglio dei talli di *P. furfuracea* sugli espositori (f-g).

ALLEGATO D. Esempi di schede informative

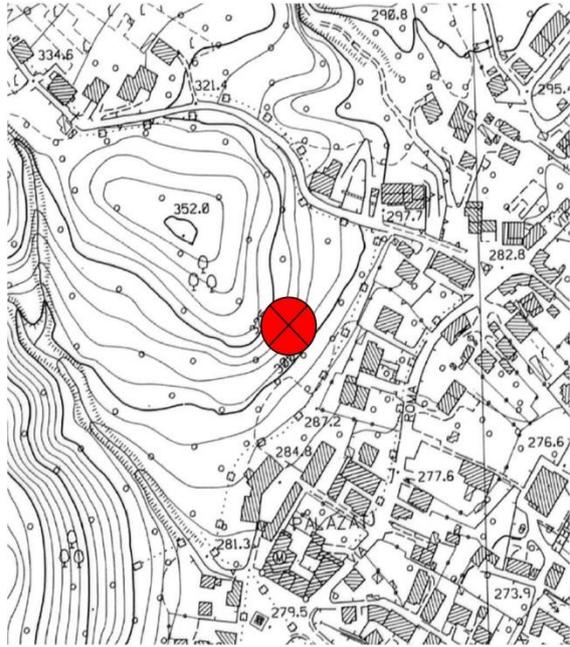
Data	Nome/i e istituzione/i	
UC	Località	
Latitudine (UTM)	Note	
Longitudine (UTM)		
Altitudine (m s.l.m.)		
Specie arborea substrato	Localizzazione della UC	
Albero standard con licheni nativi (foto)		
		
Valori medi di concentrazione elementare e deviazioni standard associate ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
Al	Cs	S
As	Fe	Se
Ba	K	Sn
Be	Hg	Ti
Ca	Li	U
Cd	Ni	V
Co	Na	Zn
Cr	Pb	Zr

Figura D1 – *Biomonitoraggio mediante licheni nativi*^N.

Esempio di scheda informativa sulle attività di campo e sui risultati ottenuti per ciascuna UC.

Data		Nome/i e istituzione/i
Località	Nome della località	Latitudine (UTM)
		Longitudine (UTM)
		Altitudine (m s.l.m.)
	Note	
Caratteristiche vegetazionali	Specie arborea substrato	
	Note	
Substrato litologico	Macro-categoria litologica	<input type="checkbox"/> Calcari e dolomie <input type="checkbox"/> Arenarie <i>sensu lato</i> <input type="checkbox"/> Rocce ignee effusive <input type="checkbox"/> Rocce ignee intrusive <input type="checkbox"/> Rocce metamorfiche <input type="checkbox"/> Rocce clastiche
	Substrato/i litologico/i	
	Presenza di affioramenti	<input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no
	Note	
Antropizzazione	Distanza dall'area edificata più vicina (km)	
	Aree rurali nelle vicinanze	<input type="checkbox"/> si (distanza: m) <input type="checkbox"/> no
	Strade nelle vicinanze	<input type="checkbox"/> si (distanza: m) <input type="checkbox"/> no
	Tipologia di strada/e	<input type="checkbox"/> Strada secondaria asfaltata <input type="checkbox"/> Strada sterrata <input type="checkbox"/> Altro
	Note	
Informazioni aggiuntive		

Figura D2 – *Biomonitoraggio mediante trapianti lichenici* ^T.

Esempio di scheda di campo per la raccolta del materiale lichenico nell'area di background.

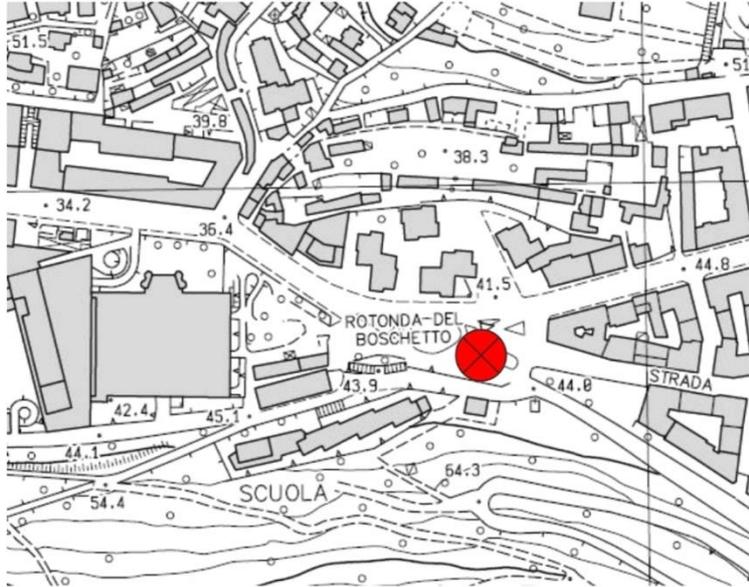
Data	Nome/i e istituzione/i				
UC	Località				
Latitudine (UTM)	Note				
Longitudine (UTM)					
Altitudine (m s.l.m.)					
Supporto con trapianti (foto)	Localizzazione della UC				
					
Valori medi di concentrazione elementare e deviazioni standard associate ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Al		Cs		S	
As		Fe		Se	
Ba		K		Sn	
Be		Hg		Ti	
Ca		Li		U	
Cd		Ni		V	
Co		Na		Zn	
Cr		Pb		Zr	

Figura D3 - Biomonitoraggio mediante trapianti lichenici *T.*
 Esempio di scheda informativa sulle attività di campo e sui risultati ottenuti per ciascuna UC.

ALLEGATO E. Informazioni necessarie alla fine della campagna di monitoraggio

Ogni studio deve riportare i seguenti dati:

- Gestione del progetto.
- Procedure Operative Standard adottate.
- Project manager(s).
- Nome dell'operatore/i;
- Intervallo temporale del monitoraggio.
- Nome geografico dell'area di background T .
- Nome geografico dell'area di studio.
- Specie di licheni selezionate.
- Specie arborea substrato nell'area di background T o nell'area di studio N .
- Parte dell'albero selezionata per l'esposizione del lichene (tronco o rami) e posizione degli espositori rispetto alla chioma dell'albero (sotto la chioma dell'albero, al di fuori della chioma dell'albero) T .
- Numero e dimensione delle unità di campionamento.
- Elenco degli elementi chimici indagati.
- Valori di concentrazione di ciascun elemento per ogni campione lichenico.
- Media e deviazione standard delle concentrazioni di ciascun elemento per ogni UC.
- Percentuali medie di recupero e limiti di confidenza al 95% per ciascun elemento certificato in un MSR relativo ad una matrice lichenica.
- Manager per il controllo della qualità dei dati.
- Risultati dell'attività di controllo della qualità dei dati.

ALLEGATO F. Metodi di campionamento probabilistico

Al fine di ottenere un campionamento rappresentativo, le UC devono essere posizionate in base ad un piano di campionamento appropriato atto a minimizzare tempi e costi senza perdere informazioni statistiche rilevanti. Per l'esposizione di campioni lichenici nel dominio di studio (par. 2.2) è consentita qualsiasi strategia di campionamento probabilistico. Tra gli approcci più utilizzati, si ricordano il campionamento sistematico, casuale semplice, casuale stratificato e “a grappoli”. Metodi più complessi possono facilmente essere reperiti in letteratura (e.g., Manly & Alberto, 2014). Qualunque sia la strategia di campionamento adottata, una sua accurata descrizione deve sempre essere inclusa nella relazione tecnica finale.

Campionamento Sistematico

Il campionamento sistematico (*Systematic Sampling*, SS) è un metodo di campionamento probabilistico in cui le UC vengono selezionate nel dominio di studio in base ad un punto di partenza casuale e un intervallo spaziale fisso (Fig. F1). Questo intervallo (l'intervallo di campionamento), viene calcolato dividendo l'area di studio per la dimensione campionaria desiderata (l'intervallo di campionamento è determinato in anticipo e il punto di partenza viene selezionato casualmente). Nell'esempio seguente, il dominio di studio è suddiviso in quadrati di 1 km² etichettati con codici alfanumerici e le UC sono posizionate sistematicamente al centro di ciascun quadrato.

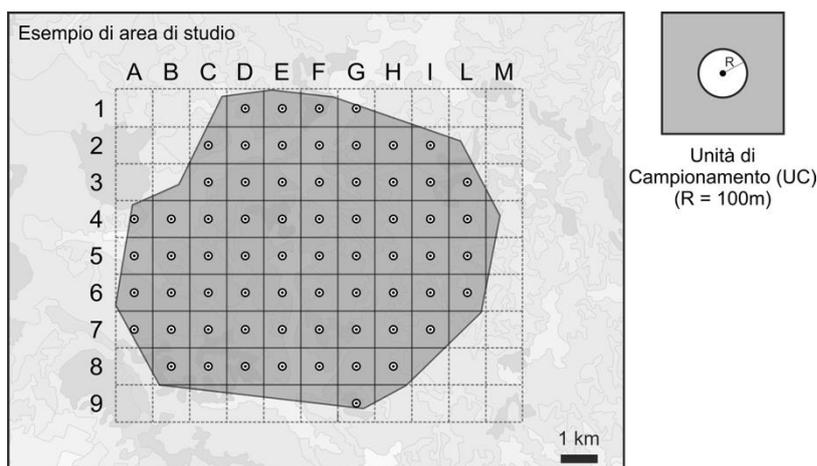
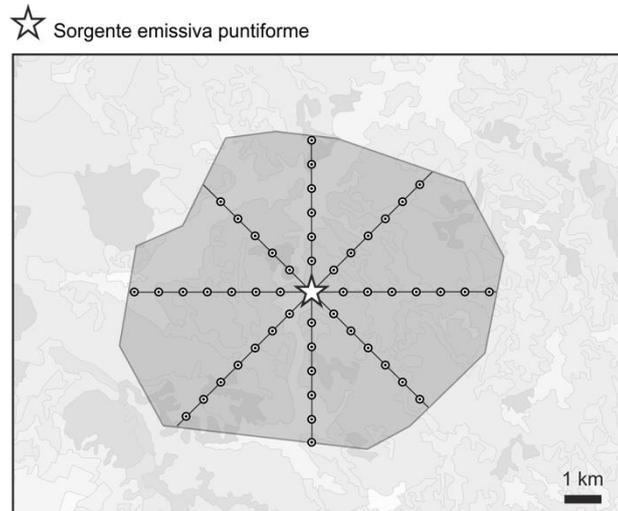


Figura F1 – Campionamento sistematico.

Un caso speciale di SS consiste nel posizionamento delle UC ad intervalli fissi lungo transetti lineari (Fig. F2). Questa strategia di campionamento può essere utilizzata, ad esempio, qualora si evidenzino gradienti di deposizione di inquinanti nell'ambito di studi pilota. Inoltre, i transetti lineari possono essere posizionati in base alla direzione dei venti prevalenti nel caso in cui si sia interessati a sorgenti puntiformi di inquinamento (es. Tretiach et al., 2011; Nannoni et al., 2017).

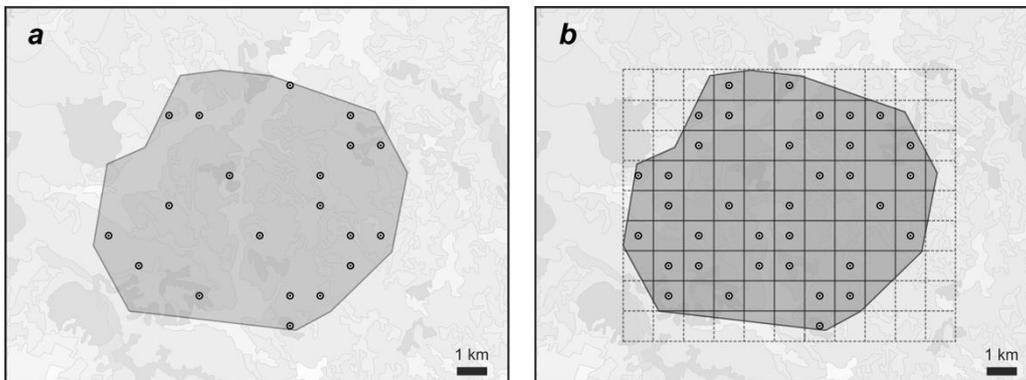


UC posizionate sistematicamente lungo transetti lineari

Figura F2 – *Campionamento sistematico lungo transetti lineari.*

Campionamento casuale

Nel campionamento casuale semplice (*Random Sampling, RS*), ciascuna UC è posizionata casualmente all'interno del dominio di studio selezionando in modo casuale (i) le coordinate del suo centro (Fig. F3-a) oppure (ii) un quadrato all'interno dell'area di studio (Fig. F3-b); in quest'ultimo caso, la UC viene posizionata sistematicamente al centro del quadrato selezionato. Questa strategia di campionamento è particolarmente adatta per aree omogenee di estensione spaziale limitata. Tuttavia in aree di studio ampie ed eterogenee, il RS può aumentare significativamente i costi relativi agli spostamenti tra UC.



UC centrate in coppie di coordinate estratte random

UC centrate in quadrati (1km×1km) estratti random

Figura F3 – *Campionamento casuale semplice.*

Un caso speciale di RS è il campionamento casuale stratificato (*Stratified Random Sampling, SRS*), una strategia adatta in caso di aree di studio eterogenee. Per esempio, questo approccio può essere utilizzato con successo in caso di aree eterogenee in termini di uso del suolo, nel qual caso si definiranno diversi strati (par. 2.2) per i loro diversi utilizzi. All'interno di ciascuno strato le UC saranno selezionate tramite estrazione casuale (i) delle coordinate del centro (Fig. F4-a) oppure (ii) dei quadrati all'interno dell'area di studio (Fig. F4-b).

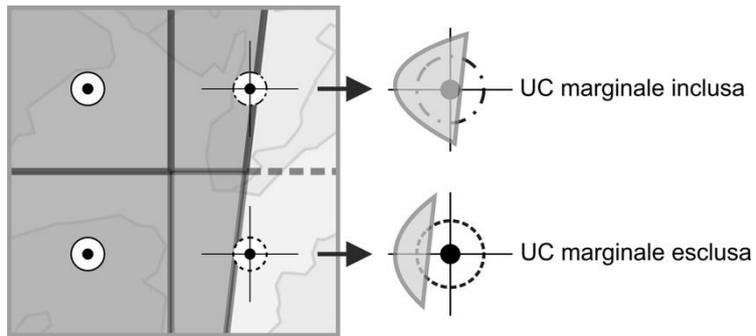


Figura F6 – *Un possibile criterio di esclusione/inclusione delle UC di confine.*

```

M<-matrix(ncol=length(Fe)-1, nrow=1000*(length(Fe)-3))
for (i in 3:(length(Fe)-1))
{
  for (j in 1:1000)
  {
    B<-sample(Fe, i, replace=TRUE)
    c<-(length(Fe)-1)-i
    B<-c(B, rep(NA,c))
    as.vector(B)
    ifelse(i==3, x<-j, x<-(j+(1000*i)-3000))
    M[x, ]<-B
  }
}

Value<-rowMeans(M, na.rm=TRUE)
n<-length(Fe)-1-(apply(M, 1, function(z) sum(is.na(z))))
Var<-apply(M, 1, var, na.rm=TRUE)
M_mean<-as.data.frame(cbind(n, Value))
M_var<-as.data.frame(cbind(n, Var))
n_cat<-as.data.frame(M_mean$n)
Mean<- aggregate(x = M_mean, by = n_cat, FUN = mean)
S2<- aggregate(x = M_var, by = n_cat, FUN = mean)

Table<-as.data.frame(cbind(Mean$n, Mean$Value, S2$Var))
colnames(Table)<-c("n", "Mean", "S2")

Table$Sd<-sqrt(Table$S2)
Table$Se<-Table$Sd/sqrt(Table$n)
Table$CV<-Table$Sd/Table$Mean
Table$uCI<-Table$Mean+qt(1-0.05/2, Table$n-1)*Table$Sd/sqrt(Table$n)
Table$lCI<-Table$Mean-qt(1-0.05/2, Table$n-1)*Table$Sd/sqrt(Table$n)
Table$CI95<-(qt(1-0.05/2, Table$n-1))*Table$Sd/sqrt(Table$n)
Table$Unc<-((Table$CI95)/Table$Mean)*100

Table

write.table(Table, file="Fe.txt", quote=T, sep=" ", dec=".",
na="NA", row.names=T, col.names=T)

plot(Table$n, Table$Mean, ylim=range(c(0, Table$Mean+Table$CI95)))
arrows(Table$n, Table$Mean-Table$CI95, Table$n,
Table$Mean+Table$CI95, length=0.05, angle=90, code=3)
abline(h=10, col="red")

plot(Table$n, Table$Unc)
abline(h=20, col='blue')

```

Tabella G1 - Output principale dello script R.

Tabella modificata ottenuta tramite lo script R. I dati si riferiscono alla dimensione del subset (n), alla media complessiva (Mean) e alla varianza media complessiva (S2) delle concentrazioni di Fe, nonché alla corrispondente deviazione standard (Sd), errore standard (Se), coefficiente di variazione (CV), limiti di confidenza superiori e inferiori al 95% (uCI and lCI), intervallo di confidenza (CI95) e incertezza percentuale associata (Unc).

n	Mean	S2	Sd	Se	CV(%)	uCI	lCI	CI95	Unc(%)	n	Mean	S2	Sd	Se	CV(%)	uCI	lCI	CI95	Unc(%)
3	260	8034	90	52	34.5	483	37	223	85.7	22	258	7823	88	19	34.2	298	219	39	15.2
4	256	7735	88	44	34.3	396	116	140	54.6	23	258	7770	88	18	34.1	296	220	38	14.8
5	257	7949	89	40	34.7	368	146	111	43.1	24	259	7852	89	18	34.3	296	221	37	14.5
6	258	7958	89	36	34.6	351	164	94	36.3	25	258	7852	89	18	34.3	295	222	37	14.2
7	257	7791	88	33	34.3	339	176	82	31.7	26	258	7671	88	17	33.9	293	223	35	13.7
8	259	7922	89	31	34.4	333	185	74	28.7	27	257	7833	89	17	34.4	292	222	35	13.6
9	258	7812	88	29	34.2	326	190	68	26.3	28	259	7925	89	17	34.4	294	224	35	13.3
10	258	8066	90	28	34.8	322	194	64	24.9	29	257	7829	88	16	34.4	291	224	34	13.1
11	258	7720	88	26	34.1	317	199	59	22.9	30	259	7788	88	16	34.1	292	226	33	12.7
12	258	7870	89	26	34.4	314	202	56	21.9	31	258	7841	89	16	34.3	291	226	32	12.6
13	258	7737	88	24	34.1	311	205	53	20.6	32	258	7907	89	16	34.4	290	226	32	12.4
14	260	8040	90	24	34.5	311	208	52	19.9	33	258	7976	89	16	34.6	290	227	32	12.3
15	258	7850	89	23	34.3	307	209	49	19.0	34	258	7878	89	15	34.3	289	227	31	12.0
16	258	7934	89	22	34.5	306	211	47	18.4	35	259	7832	88	15	34.2	290	229	30	11.7
17	258	7821	88	21	34.2	304	213	45	17.6	36	258	7897	89	15	34.5	288	228	30	11.7
18	258	7862	89	21	34.4	302	214	44	17.1	37	258	7850	89	15	34.3	288	229	30	11.4
19	258	7746	88	20	34.1	300	215	42	16.5	38	259	7852	89	14	34.2	288	230	29	11.2
20	258	7592	87	19	33.8	298	217	41	15.8	39	258	7800	88	14	34.3	286	229	29	11.1
21	258	7870	89	19	34.4	298	218	40	15.7	40	258	7875	89	14	34.4	286	229	28	11.0

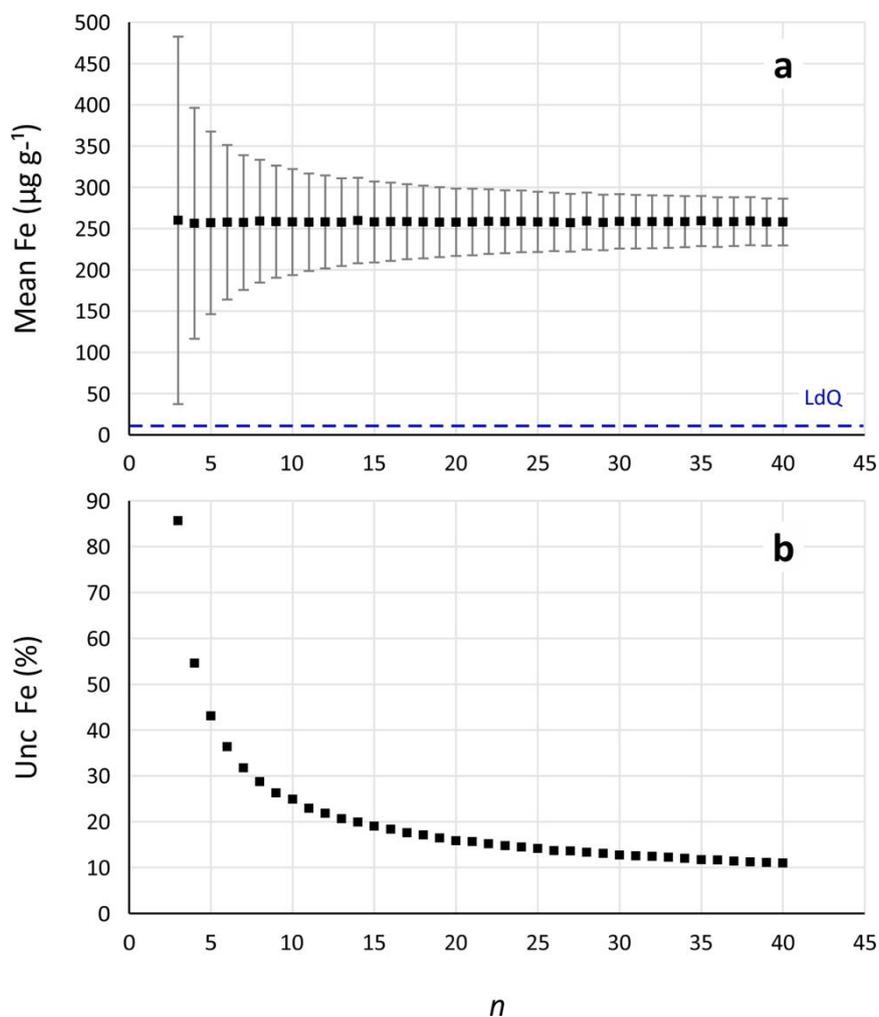


Figura G1 – Output grafico dello script R.

Output grafico modificato dello script R. Media complessiva delle concentrazioni di Fe (Mean Fe) vs. dimensione del subset n (le barre di errore indicano l'intervallo di confidenza al 95%), con indicazione del Limite di Quantificazione (LdQ, linea tratteggiata blu); per ciascun elemento, il LdQ della procedura analitica dovrebbe sempre essere inferiore al valore della media complessiva corrispondente alla più piccola dimensione del subset ($n = 3$) diminuita dell'intervallo di confidenza al 95%: $LdQ < Mean - CI95$ (a). Incertezza percentuale associata al Fe (Unc Fe) vs. dimensione del subset n (b).

Stima del numero di campioni non esposti da analizzare

Il numero minimo di campioni non esposti da sottoporre a determinazione analitica (N^*) in successivi studi di biomonitoraggio basati su trapianti sarà dato dalla media aritmetica delle dimensioni dei subset corrispondenti ad un'incertezza percentuale del 20% circa (n^*) calcolate per ciascun elemento di interesse, così come mostrato in Fig. G2 per l'elemento esemplificativo Fe.

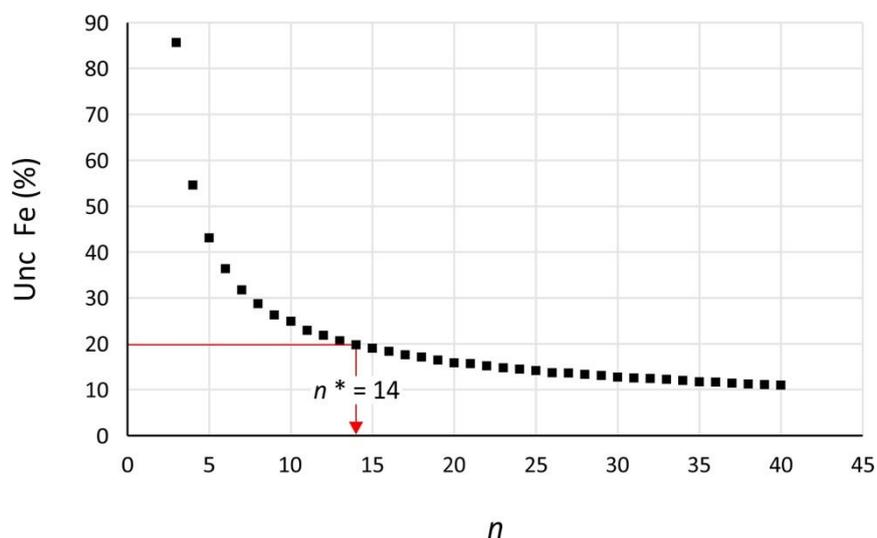


Figure G2 – Dimensione del subset corrispondente ad un'incertezza del 20%.

Dimensione del subset corrispondente ad un'incertezza percentuale del 20% circa (n^*) per l'elemento esemplificativo Fe. L'incertezza corrispondente a $n^* = 14$ è del 19.9% (si veda la Tabella G1).

Per motivi di fattibilità pratica, e per evitare l'uso di materiale lichenico affetto da un'eccessiva variabilità in termini di contenuto elementare, il numero di campioni non esposti da analizzare (N^*) non dovrà essere superiore a 25. In caso contrario l'area selezionata non potrà essere considerata un'area di background.

Si consideri un set di m elementi e sia n_i^* la dimensione del subset corrispondente ad un'incertezza del 20% per l' i -esimo elemento. Il numero minimo di campioni non esposti da analizzare sarà dato da:

$$N^* = \frac{\sum_{i=1}^m n_i^*}{m} \leq 25$$

Una volta stimato, tale numero potrà essere mantenuto costante per le successive campagne di biomonitoraggio basate sul medesimo materiale lichenico.

ALLEGATO H. Procedure di *mapping*

I risultati delle campagne di biomonitoraggio basate sui licheni nativi (capitolo 3) e sui trapianti lichenici (capitolo 4) devono essere rappresentati per mezzo di elaborazioni cartografiche intelleggibili che riportino le concentrazioni degli elementi bioaccumulati in ciascuna SU e i loro andamenti spaziali. Le elaborazioni cartografiche possono essere facilmente realizzate avvalendosi di software appropriati (p. es., Arcgis®, Qgis, R, etc.) e utilizzando come dataset di origine la matrice delle concentrazioni elementari o i valori di B ed $EU\ ratio$ (par. 3.7.2 e 4.8.2) nelle UC.

Tipicamente si utilizzano due approcci cartografici per i dati di biomonitoraggio: il primo è descrittivo e mira alla rappresentazione delle classi di bioaccumulo e della loro incertezza associata (approccio descrittivo), mentre il secondo approccio implica un'interpolazione geostatistica delle concentrazioni elementari o dei valori di B o $EU\ ratio$ al fine di rappresentare spazialmente i pattern degli inquinanti nell'area di studio (approccio geostatistico).

Approccio descrittivo

Queste elaborazioni cartografiche rappresentano le UC sulla base della loro classe di bioaccumulo e della loro incertezza relativa associata (*relative uncertainty, RU*). È importante notare che il calcolo e la resa grafica dell'incertezza relativa garantiscono la possibilità di effettuare confronti inter-studio. In particolare, per la i -esima UC, l'incertezza relativa può essere calcolata come segue:

$$\text{Licheni nativi: } RU^{(i)} = \frac{\Delta(B^{(i)})}{B^{(i)}} \times 100; \text{ Trapianti lichenici: } RU^{(i)} = \frac{\Delta(EU^{(i)})}{EU^{(i)}} \times 100$$

$B^{(i)}$, $EU^{(i)}$: valori medi di B ed $EU\ ratio$ per la i -esima UC (formula 3.1, par. 3.6; formula 4.1, par. 4.7);
 $\Delta(B^{(i)})$, $\Delta(EU^{(i)})$: incertezze di $B^{(i)}$ ed $EU^{(i)}$ (formula 3.3, par. 3.7.3; formula 4.4 par. 4.8.3).

In queste mappe, i colori e le dimensioni dei simboli che rappresentano le UC devono essere scelti in base alle classi di bioaccumulo corrispondenti (Tabelle 3.3 e 4.2 nei par. 3.7.2 and 4.8.2) e alle loro incertezze relative. Un esempio di output cartografico per i trapianti lichenici è fornito in Fig. H1.

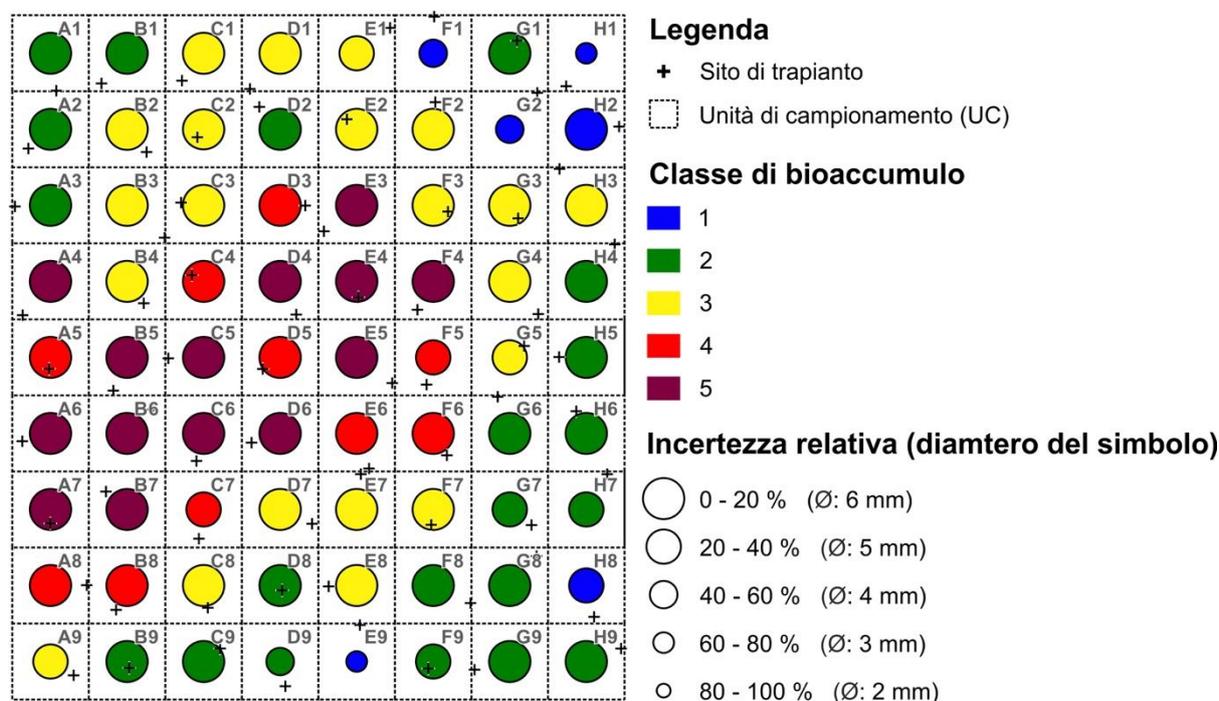


Figura H1 – Esempio di rappresentazione descrittiva delle UC (trapianti lichenici).

Le classi di bioaccumulo e le incertezze relative associate sono rappresentate tramite colori (si veda la Tabella 4.2) e dimensioni differenti per ciascuna UC nell'area di studio.

Approccio geostatistico

Al fine di individuare gli andamenti spaziali degli inquinanti target, i valori di B ed EU ratio, o alternativamente i valori di concentrazione elementare (le variabili target), devono essere soggetti ad interpolazione geostatistica. In questo contesto, si raccomanda l'utilizzo di metodi di interpolazione basati su algoritmi non deterministici, p. es. il Kriging. In effetti gli algoritmi di Kriging, oltre a predire i valori della variabile target in ogni punto dell'area di studio (Fig. H2-a), forniscono anche una stima dell'incertezza delle superfici interpolate (Fig. H2-b) in base allo specifico modello statistico utilizzato (p. es, il cosiddetto semivariogramma; Tao, 1995). Per una descrizione dettagliata dei metodi di interpolazione e il loro campo di applicazione, si vedano i manuali online dei software sopra-citati e, per esempio, Aboal et al. (2006) e Real et al. (2003).

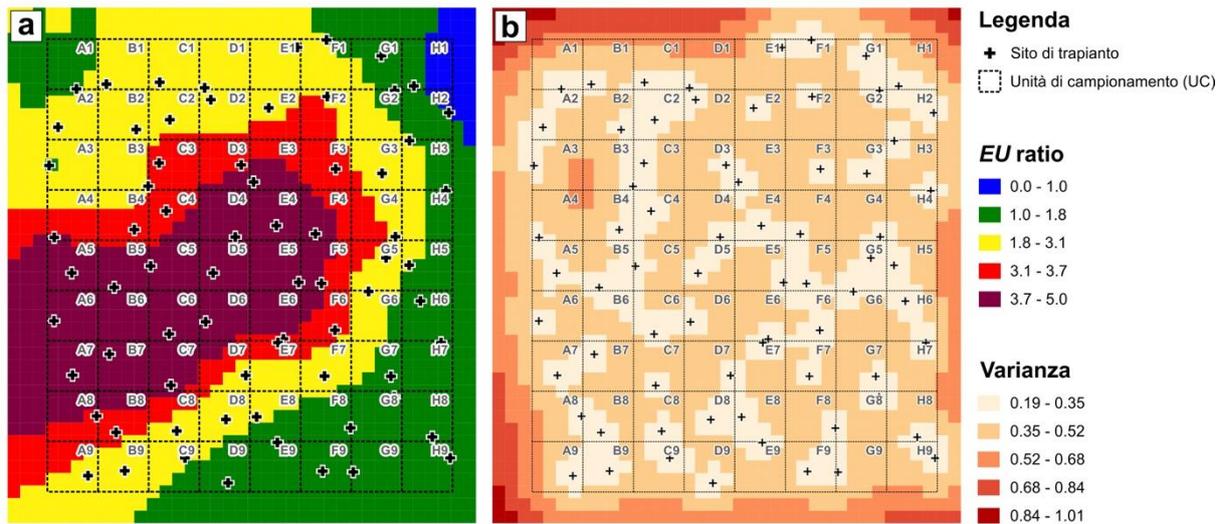


Figura H2 – Esempio di interpolazione geostatistica su dati di EU ratio (trapianti lichenici). Pattern spaziale di EU ratio ottenuto con il metodo di interpolazione del Kriging ordinario (a); incertezza associata alle superfici di interpolazione espressa in termini di varianza (b).

BIBLIOGRAFIA

- Aboal JR, Real C, Fernández JA, Carballeira A (2006) Mapping the results of extensive surveys: the case of atmospheric biomonitoring and terrestrial mosses. *Science of the Total Environment* 356, 256-274.
- Adamo P, Giordano S, Vingiani S, Castaldo Cobiainchi R, Violante P (2003) Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution* 122, 91-103.
- Adamo P, Bargagli R, Giordano S, Modenesi P, Monaci F, Pittao E, Spagnuolo V, Tretiach M (2008) Natural and pre-treatments induced variability in the chemical composition and morphology of lichens and mosses selected for active monitoring of airborne elements. *Environmental Pollution* 152(1), 11-19.
- Bargagli R, Mikhailova I (2002) Bioaccumulation of inorganic contaminants. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (Eds.), *Monitoring with Lichens-Monitoring Lichens*. Springer-Verlag, Berlin, 324 pp.
- Bargagli R, Iosco FP, D'Amato ML (1987) Zonation of trace metal accumulation in three species of epiphytic lichens belonging to the genus *Parmelia*. *Cryptogamie, Bryologie, Lichénologie* 8, 331-337.
- Baruffo L, Tretiach M, Zedda L, Leuckert Ch (2001) Sostanze licheniche: come riconoscerle e perché. *Notiziario della Società Lichenologica Italiana* 14, 5-33.
- Bettinelli M, Spezia S, Bizzarri G (1996) Trace elements determination in lichens by ICP-MS. *Atomic Spectroscopy* 17, 133-141.
- Bossard M, Feranec J, Otahel J (2000) CORINE land cover technical guide – Addendum 2000. European Environment Agency. EEA Copenhagen.
- Brunialti G, Frati L (2007) Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: a retrospective study over a 7-year time span. *Science of the Total Environment* 387, 289-300.
- Brunialti G, Giordani P, Isocrono D, Loppi S (2002) The evaluation of data quality in lichen biomonitoring studies: the Italian experience. *Environmental Monitoring and Assessment* 75, 271-280.
- Brunialti G, Giordani P, Ferretti M (2004) Discriminating between the good and the bad: quality assurance is central in biomonitoring studies. *Environmental Monitoring* 20, 443-464.
- Cecconi E, Incerti G, Capozzi F, Adamo P, Bargagli R, Benesperi R, Candotto Carniel F, Favero-Longo SE, Giordano S, Puntillo D, Ravera S, Spagnuolo V, Tretiach M (2018) Background element content of the lichen *Pseudevernia furfuracea*: A supra-national state of art implemented by novel field data from Italy. *Science of the Total Environment* 622, 282-292.
- Cecconi E, Fortuna L, Benesperi R, Bianchi E, Brunialti G, Contardo T, Di Nuzzo L, Frati L, Monaci F, Munzi S, Nascimbene J, Paoli L, Ravera S, Vannini A, Giordani P, Loppi S, Tretiach M (2019a) New interpretative scales for lichen bioaccumulation data: the Italian proposal. *Atmosphere* 10, 136.
- Cecconi E, Incerti G, Capozzi F, Adamo P, Bargagli R, Benesperi R, Candotto Carniel F, Favero-Longo SE, Giordano S, Puntillo D, Ravera S, Spagnuolo V, Tretiach M (2019b). Background element content in the lichen *Pseudevernia furfuracea*: A comparative analysis of digestion methods. *Environmental Monitoring and Assessment* 191, 260.
- Cline SP, Burkman WG (1989) The role of quality assurance in ecological programs. In: Bucher JB, Bucher-Wallin I (Eds.), *Air Pollution and Forest Decline, Proceedings of the 14th International Meeting for Specialists on Air Pollution Effects on Forest Ecosystems, IUFRO P2.05, Inter-laken, Switzerland, Oct. 2-8 (1988)* Birmensdorf, pp. 361-365.
- Elzinga CL, Salzer DW, Willoughby JW, Gibbs JP (2001) *Monitoring plant and animal populations*. Blackwell Science, Malden, Massachusetts.
- Fortuna L, Tretiach M (2018) Effects of site-specific climatic conditions on the radial growth

-
- of the lichen biomonitor *Xanthoria parietina*. *Environmental Science and Pollution Research* 25(34), 34017-34026.
- Frati L, Brunialti G, Loppi S (2005) Problems related to lichen transplants to monitor trace element deposition in repeated surveys: a case study from Central Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry* 52, 221-230.
- Giordani P, Brunialti G, Benesperi R, Rizzi G, Frati L, Modenesi P (2009) Rapid biodiversity assessment in lichen biomonitoring surveys: implications for quality assurance. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 730–735.
- Hale ME, Lawrey JD (1985) Annual rate of lead accumulation in the lichen *Pseudoparmelia baltimorensis*. *The Bryologist* 88, 5-7.
- Honegger R (2003) The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5, 324-330.
- Incerti G, Cecconi E, Capozzi F, Adamo P, Bargagli R, Benesperi R, Candotto Carniel F, Cristofolini F, Giordano S, Puntillo D, Spagnuolo V, Tretiach M (2017) Intraspecific variability in baseline element composition of the epiphytic lichen *Pseudevernia furfuracea* in remote areas: implications for biomonitoring of air pollution. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 8004-8016.
- Jensen M (2002) Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. In: Kranner IC, Beckett RP, Varma AK (Eds.) *Protocols in Lichenology*. Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 135-151.
- Kodnik D, Candotto Carniel F, Licen S, Tolloi A, Barbieri P, Tretiach M (2015) Seasonal variations of PAHs content and distribution patterns in a mixed land use area: a case study in NE Italy with the transplanted lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Atmospheric Environment* 113, 255-263.
- Loppi S, Ravera S, Paoli L (2019) Coping with uncertainty in the assessment of atmospheric pollution with lichen transplants. *Environmental Forensics*, DOI: 10.1080/15275922.2019.1627615.
- Manly BF, Alberto JAN (Eds.) (2014) *Introduction to ecological sampling*. CRC Press.
- Markert B (1995) Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *Science of the Total Environment* 176, 45–61.
- McCune B, Dey J, Peck J, Cassell D, Heiman K, Will-Wolf S, Neitlich P (1997) Repeatability of community data: species richness versus gradient scores in large-scale lichen studies. *The Bryologist* 100, 40-46.
- Nannoni F, Mazzeo R, Santolini R., Protano G (2017) Multi-matrix environmental monitoring to assess heavy element distribution around a municipal solid waste landfill in Italy. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14(12), 2591–2602.
- Nimis PL (2016) *The Lichens of Italy. A Second Annotated Catalogue*. EUT, Trieste, 739 pp.
- Nimis PL, Martellos S (2017) ITALIC - The Information System on Italian Lichens. Version 5.0. University of Trieste, Dept. of Biology (<http://dryades.units.it/italic>).
- Nimis PL, Andreussi S, Pittao E (2001) The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the Total Environment* 275, 43-51.
- Orange A, James PW, White FJ (2001) *Microchemical methods for the identification of lichens*. Twayne Publishers.
- Quevauviller P, Herzig R, Muntau H (1996) Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring. *Science of the Total Environment* 187, 143-152.
- Real C, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A (2003) The use of native mosses to monitor fluorine levels - and associated temporal variations - in the vicinity of an aluminium smelter. *Atmospheric Environment* 37, 3091-3102.
- Roos-Barraclough F, Givélet N, Martinez-Cortizas A, Goodsite ME, Biester H, Shotykh W (2002) An analytical protocol for the determination of total mercury concentrations in solid peat samples. *Science of the Total Environment* 292, 129-139.

-
- Shampine WJ (1993) Quality assurance and quality control in monitoring programs. *Environmental Monitoring and Assessment* 26, 143-151.
- Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ, Fletcher A, Gilbert OL, James PW, Wolseley PA (2009) *The lichens of Great Britain and Ireland*. London: The British Lichen Society, 1046 pp.
- Stone SF, Freitas MC, Parr RM, Zeisler R (1995) Elemental characterization of a candidate lichen research material—IAEA-336. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 352(1), 227-231.
- SW-846 EPA Method 3052, Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste, 3rd Edition, 3rd Update*, US Environmental Protection Agency, Washington DC, 1995.
- Tao S (1995) Kriging and mapping of copper, lead, and mercury contents in surface soil in Shenzhen area. *Water, Air, and Soil Pollution* 83, 161-172.
- Tretiach M, Carpanelli A (1992) Morphology and chlorophyll content as factors influencing the photosynthetic rates of *Parmelia caperata* (L.) Ach. *Lichenologist* 24, 81-90.
- Tretiach M, Candotto Carniel F, Loppi S, Carniel A, Bortolussi A, Mazzilis D, Del Bianco C (2011) Lichen transplants as a suitable tool to identify mercury pollution from waste incinerators: a case study from NE Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* 175, 589-600.
- US EPA (2002) *Guidance for Quality Assurance Project Plans*. EPA QA/G-5, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Wolterbeek HT, Bode P (1995) Strategies in sampling and sample handling in the context of large-scale plant biomonitoring surveys of trace element air pollution. *Science of the Total Environment* 176, 33-43.
- Yafa C, Farmer JG (2006) A comparative study of total and acid-extractable digestion methods for the determination of inorganic elements in peat material by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 557, 296-303.

