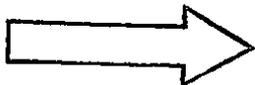




L'ENERGIA CHE TI ASCOLTA.

DIVISIONE GENERAZIONE ED ENERGY MANAGEMENT
AREA TECNICA SVILUPPO E ASSISTENZA IMPIANTI

00198 Roma, Viale Regina Margherita 125
T +39 0683054401 - F +39 0683054406



Enel-PRO-10/02/2011-0006442
Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare - Direzione Generale Valutazioni Ambientali

E.prol DVA-2011-0003584 del 15/02/2011

MINISTERO DELL'AMBIENTE E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE
D.G. per le Valutazioni Ambientali
Divisione II - Sistemi di Valutazione Ambientale
Via Cristoforo Colombo, 44
00147 - ROMA

MINISTERO DELL'AMBIENTE E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE
D.G. per le Valutazioni Ambientali
Divisione IV - Rischio Rilevante e AIA
Via Cristoforo Colombo, 44
00147 - ROMA

ISPRA
Via Vitaliano Brancati, 48
00144 - ROMA

ARPAV VENETO
Via Matteotti, 27
35137 - PADOVA

e.p.c. **MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO**
DIPARTIMENTO PER L'ENERGIA
D.G. per l'Energia Nucleare, le Energie Rinnovabili e l'Efficienza Energetica
Ufficio XII - Produzione Elettrica
Via Molise, 2
00187 - ROMA

MINISTERO PER I BENI E LE ATTIVITÀ CULTURALI
D.G. per il Paesaggio, le Belle Arti, l'Architettura e l'Arte Contemporanea
Servizio IV - Tutela e Qualità del Paesaggio
Via di San Michele, 22
00153 - ROMA

REGIONE VENETO
Al Presidente
Palazzo Balbi
Dorsoduro 3901
30123 - VENEZIA

REGIONE VENETO
Assessore all'Ambiente
Palazzo Balbi
Dorsoduro 3901
30123 - VENEZIA



55017224693



L'ENERGIA CHE TI ASCOLTA.

REGIONE VENETO
Assessore all'Energia
Palazzo Balbi
Dorsoduro 3901
30123 - VENEZIA

REGIONE VENETO
Direzione Tutela Ambiente
Unità Complessa VIA
Calle Priuli - Palazzo Linetti
Cannaregio, 99
30121 - VENEZIA

Al Presidente della
**COMMISSIONE TECNICA DI VALUTAZIONE
DELL'IMPATTO AMBIENTALE**
c/o Ministero dell'Ambiente e della Tutela del
Territorio e del Mare
Via Cristoforo Colombo, 44
00147 - Roma

Al Presidente della
**COMMISSIONE ISTRUTTORIA PER
L'AUTORIZZAZIONE INTEGRATA AMBIENTALE
IPPC**
C/O ISPRA
Via Curtatone, 3
00185 - Roma

ARPA VENETO - DAP ROVIGO
Via Porta Po, 87
45100 - ROVIGO

Oggetto : Progetto di trasformazione a carbone della Centrale Termoelettrica di Porto Tolle (RO) - Decreto di pronuncia di Compatibilità Ambientale prot. DSA-DEC-2009-0000873 del 24/07/2009 - Prescrizioni A.17 e A.36 b) - Piano di Biomonitoraggio terrestre.

Ci riferiamo alle prescrizioni del Decreto di pronuncia di Compatibilità Ambientale prot. DSA-DEC-2009-0000873 del 24/07/2009 relativo al Progetto di trasformazione a carbone della Centrale Termoelettrica di Porto Tolle (RO), come recepito dal Decreto di Autorizzazione Unica del Ministero dello Sviluppo Economico n. 55/01/2011, e in particolare alla parti delle prescrizioni A.17 e A.36 b) concernenti il Piano di biomonitoraggio terrestre della qualità dell'aria,



L'ENERGIA CHE TI ASCOLTA.

per trasmettere in allegato il documento di ottemperanza, per le valutazioni di Vostra competenza.

Restando in attesa di un Vs. riscontro inviamo distinti saluti.

Leonardo Arrighi
IL RESPONSABILE

A handwritten signature in black ink, appearing to be "LA", positioned below the typed name and title.

All: e.s.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "AUT", positioned below the text "All: e.s.".

Indice

1	PREMESSA	3
2	PRINCIPI DELLA PROGETTAZIONE.....	4
3	STRUTTURA DEL PROGETTO	6
4	BIBLIOGRAFIA.....	9

FIGURE FUORI TESTO:

Figura 3-a. Area di interesse ai fini del monitoraggio e ubicazione dei contributi gassosi di SO₂.

ALLEGATI:

ALLEGATO I. PROGETTAZIONE DEL MONITORAGGIO BIOLOGICO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA DEL TERRITORIO CIRCOSTANTE IL COMUNE DI PORTO TOLLE (RO). UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA. Prot B0033706 pagine 97

STORIA DELLE REVISIONI

Numero revisione	Data	Protocollo	Lista delle modifiche e/o dei paragrafi modificati
0	07/12/2010	A9028440	Prima emissione

1 PREMESSA

A seguito del Decreto di pronuncia di Compatibilità Ambientale da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare relativa al Progetto di conversione a carbone della Centrale Termoelettrica di Porto Tolle, ubicata nel Comune di Porto Tolle (RO) in luogo dell'esistente Centrale Termoelettrica ad olio combustibile, viene presentato il Piano di Biomonitoraggio della Qualità dell'Aria del territorio circostante la Centrale secondo quanto disposto dalle prescrizioni n. A.17 e A.36 b, di seguito riportate, relative sia al funzionamento sia alla verifica dei potenziali effetti ambientali, del Decreto DSA-DEC-2009-0000873 del 24/07/2009:

A.17. Dovrà essere presentato a cura del proponente un piano dettagliato per il monitoraggio delle emissioni e delle ricadute al suolo e per il biomonitoraggio integrato ed avanzato con biosensori attivi e passivi sia terrestri per la qualità dell'aria con l'uso di norme consolidate come quelle delle VDI tedesche. Tale piano dovrà dettagliare le sostanze misurate, la frequenza e, nel caso delle misure di concentrazione al suolo, anche la posizione delle postazioni, oltre ad eventuali ulteriori specificazioni in merito. Tale piano dovrà essere concordato con ISPRA e ARPA Veneto, prima dell'inizio dei lavori, e sarà comunicato ai Ministeri dell'Ambiente, dello Sviluppo Economico, dei Beni Culturali ed Ambientali ed alla Regione; detto monitoraggio dovrà iniziare prima della fase di cantiere e protrarsi per una durata almeno decennale.

A.36. Almeno 90 giorni prima dell'inizio dei lavori il proponente dovrà presentare al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare che provvederà alla verifica prima dell'inizio dei lavori, i seguenti documenti tecnici di dettaglio, relativamente alla fase di cantiere per la dismissione dell'esistente e la realizzazione della nuova centrale:

a [.....]

b piano di biomonitoraggio integrato ed avanzato con biosensori e bioaccumulatori attivi e passivi sia terrestri per la qualità dell'aria sia negli ambiti di transizione salina con l'uso di norme consolidate come quelle delle VDI tedesche che dovrà essere inviato ad ISPRA e ARPA Veneto per essere poi concordata con le stesse. L'esecuzione di tale piano dovrà essere avviata entro i primi 6 mesi dall'inizio dei lavori di dismissione dell'attuale centrale e dovrà essere proseguita durante l'attività ordinaria della centrale al fine di tutelare le attività di coltivazione ittica;

c [.....]

d [.....]

e [.....]

f [.....]

Al fine di ottemperare a tali prescrizioni, Enel ha incaricato CESI di redigere il piano di monitoraggio biologico della qualità dell'aria nel rispetto di quanto richiesto nel decreto suddetto.

L'elaborazione del piano è stata condotta in collaborazione con un team di esperti del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste coordinato dal prof. Mauro Tretiach, già presidente della Società Lichenologica Italiana.

Il presente rapporto illustra i principi e la struttura del progetto di biomonitoraggio della qualità dell'aria definiti da ISMES-CESI in collaborazione con l'Università di Trieste e riporta in allegato I il progetto di dettaglio redatto dal team di esperti dell'Università di Trieste.

2 PRINCIPI DELLA PROGETTAZIONE

Dall'analisi di quanto indicato nel DSA-DEC-2009-0000873 del 24/07/2009 emerge l'esigenza di identificare le tecniche più opportune da prevedere nella la progettazione di un sistema di biomonitoraggio della qualità dell'aria in funzione delle caratteristiche del territorio monitorato. Tale processo deve considerare i diversi aspetti specifici del contesto di applicazione ed in particolare:

- la situazione territoriale sia dal punto di vista dell'uso del suolo sia da quello della disponibilità di organismi vegetali idonei allo scopo,
- la tipologia e l'ordine di grandezza delle concentrazioni delle sostanze/elementi che possono essere monitorati,
- le potenziali sorgenti delle sostanze/elementi presenti nell'area di interesse,
- la dinamica diffusiva delle emissioni dell'impianto termoelettrico considerato,
- l'esistenza di indagini ambientali pregresse che hanno utilizzato tecniche assimilabili,
- la disponibilità di metodiche consolidate (normate o messe a punto nell'ambito di ricerche interuniversitarie) o in corso di normazione applicabili nel contesto specifico.

L'area di pertinenza ricopre una superficie di 24 x 25 km circa **Figura 2-a**. Dei 600 km² considerati, le terre emerse ed i corpi idrici non marini occupano circa 488 km². Il territorio, ove si collocano centri urbani e industriali a bassa densità abitativa (17.3 km²), ha vocazione principalmente agricola (262.7 km²). La vegetazione naturale occupa circa 15.2 km², mentre ben più ampia, data la realtà fluviale del territorio, è la porzione interessata da zone umide (72.4 km²) e ancor più cospicua quella occupata da corpi idrici (95.3 km²) (Tabella 2-I).

Corine Livello 1	Legenda	Area (ha)
1	Aree artificiali	1732
2	Aree agricole	26270
3	Foreste e aree seminaturali	1515
4	Zone umide	7239
5	Corpi idrici	9528
Totale	Terre e corpi idrici non marini	46286

Tabella 2-I. Classi Corine Landcover livello 1 e area di copertura nell'ambito del territorio di pertinenza.

Le aree di interesse sono quindi costituite in massima parte da aree agricole con limitata disponibilità di elementi vegetali (es. alberi) utilizzabili ai fini del biomonitoraggio.

Bisogna inoltre considerare la particolare andamento della falda superficiale delle aree sia agricole sia naturali che in alcuni casi si trovano sotto il livello del mare/fiume; tale andamento può comportare una notevole variabilità spazio-temporale del contributo dell'assorbimento radicale agli elementi contenuti nelle foglie delle specie arboree. Il fenomeno considerato porta a sconsigliare l'utilizzo del bioaccumulo fogliare come indicatore della diffusione degli elementi in traccia veicolati in aria.

Per quanto riguarda le metodiche da utilizzare, il tipo di bioclima presente nell'area considerata limita la scelta ai protocolli applicativi nazionali in materia di biomonitoraggio; infatti le norme tecniche disponibili a livello europeo sono quelle tedesche emesse dalla VDI (Verein Deutscher Ingenieure) sotto forma di guidelines che, in qualità del carattere nazionale dell'organismo che le produce, devono essere principalmente applicabili al territorio tedesco. Infatti, la norma VDI 3957 Part 13: 2005-1, che fornisce una proposta di protocollo per il mappaggio della diversità lichenica come indicatore della qualità dell'aria (bioindicazione), a pag. 4 riporta la frase "*This method of mapping lichens is adapted to Central European conditions*"; è quindi ovvio che quanto prescritto dalla norma non può essere applicato in toto nel territorio italiano, proprio per la sostanziale diversità bioclimatica. Per quanto riguarda i principi utilizzati dalla norma VDI, sempre a pag 4 al capoverso successivo viene riportato "A

guideline based on the same proposal exists in Italy (ANPA, 2001)". Ovviamente questo non è sinonimo di identità delle due guidelines ma di sostanziale condivisione dei principi utilizzati. Inoltre, di recente è iniziato il percorso in sede CEN della norma europea nel campo della bioindicazione (CEN WG31/TC264), in cui l'ente normativo italiano (UNI) è rappresentato da membri della Società Lichenologica Italiana ed in particolare dal Dott. Guido Incerti e dal Dott. Paolo Giordani che sono due degli autori del piano di monitoraggio coordinato dal Prof. Mauro Tretiach, ed è pertanto importante considerare anche le indicazioni che sono emerse in questa sede.

Per quanto riguarda le sostanze/elementi che possono essere monitorati, sulla base della letteratura disponibile e dei metodi consolidati, si ritiene che la progettazione del biomonitoraggio debba considerare sia i gas fitotossici emessi direttamente dalle varie sorgenti (SO_2 e NO_x) sia i principali elementi in traccia che derivano dalle sorgenti antropiche e da quelle naturali (es. suolo). Relativamente agli elementi in traccia, in accordo a quanto previsto per il monitoraggio delle ricadute al suolo, dei microinquinanti e per la caratterizzazione del PM10, si possono considerare Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Zn, V. Occorre però tenere presente che alcuni degli elementi indicati potrebbero essere presenti nei biosensori vegetali a concentrazioni decisamente inferiori ai limiti di rilevanza consentiti dalle moderne tecniche analitiche.

La conoscenza di sorgenti emissive locali sia di tipo antropico sia di tipo naturale e la considerazione delle sorgenti remote per alcuni elementi (es. Cd) è sicuramente il presupposto per corretta interpretazione dei dati che verranno raccolti dal sistema di biomonitoraggio. Nel caso specifico le attività emissive antropiche nell'area, oltre alla produzione di energia elettrica, sono l'agricoltura intensiva con l'utilizzo di fertilizzanti, la bruciatura delle stoppie ed il sollevamento delle polveri di suolo, l'essiccazione del foraggio con emissioni di NO_x e SO_2 ed elementi in traccia a seconda del combustibile utilizzato ed il traffico veicolare della SS 309 Romea.

La modellazione delle dinamiche diffusive delle emissioni in atmosfera dell'impianto termoelettrico Enel (modello CALPUFF con dati meteo di riferimento anni 2007 - 2009) ha individuato aree di massima influenza delle sostanze gassose e del particolato in aria che sono ubicate entro un raggio di circa 10 km; inoltre le aree di massima deposizione al suolo di elementi emessi sono ubicate entro un raggio di qualche centinaia di metri dal punto di emissione. I valori stimati sia nel caso delle concentrazioni in aria sia nel caso delle deposizioni sono relativamente bassi; in particolare per quanto riguarda le deposizioni, si osserva che le quantità come mg/m^2 anno dei vari elementi risultano tali da non determinare, nell'arco di vita di un impianto, variazioni misurabili delle concentrazioni degli stessi elementi nei suoli interessati dai valori massimi (aree ristrette dell'ordine dell'ettaro) (CESI, 2007).

Nel territorio considerato nell'ambito della procedura di VIA sono già state effettuate indagini con le tecniche di biomonitoraggio della qualità dell'aria e, pur evidenziando difficoltà di applicazione delle metodiche normate disponibili (es. Bioindicazione lichenica ANPA, 2001), hanno fornito alcune indicazioni di massima sulla variabilità di alcuni parametri misurati con le tecniche adottate; si tratta di dati che possono essere utilizzati in modo conservativo per orientarsi nella definizione dell'entità dello sforzo campionario.

In conclusione occorre valutare che il territorio da monitorare presenta diverse caratteristiche limitanti per alcune tecniche di biomonitoraggio utilizzate:

- potenziale variabilità spazio-temporale del contributo dell'assorbimento radicale al contenuto fogliare degli elementi indagati, determinata dalla variabilità del livello della falda superficiale, che sconsiglia l'utilizzo del bioaccumulo fogliare delle specie arboree,
- possibilità di interferenza dell'aerosol marino nello sviluppo di bioaccumulatori erbacei coltivati in vaso (es. *Lolium sp.*) che può comportare efficienze di bioaccumulo diverse in funzione della distanza dalla costa.

Pertanto si propone di utilizzare le tecniche che fanno riferimento ai licheni, sia autoctoni sia alloctoni, che sono supportate da numerosi lavori sperimentali e da recenti attività di normazione e di studio da parte di gruppi di lavoro inter-universitari italiani.

3 STRUTTURA DEL PROGETTO

Sulla base di quanto esposto nel paragrafo precedente, il team di esperti dell'Università di Trieste ha realizzato un progetto del sistema di biomonitoraggio del territorio circostante la centrale termoelettrica di Porto Tolle articolandolo su tre reti di biosensori, di cui due costituite da biosensori spontaneamente presenti nel territorio (licheni epifiti) e una da realizzare con un biosensore appositamente collocato (trapianti di licheni fruticosi):

Rete con i licheni epifiti come bioindicatori. La tecnica fornisce stime sintetiche degli effetti sinergici degli inquinanti atmosferici sulle comunità licheniche epifite. I risultati consistono in indici statistici di diversità biologica e misure di abbondanza delle singole specie licheniche riferite alle stazioni di rilevamento. I dati vengono utilizzati per la produzione di modelli geostatistici di distribuzione della diversità lichenica, in forma cartografica, correlata agli effetti sinergici degli inquinanti. Il pattern di distribuzione delle diverse specie nel territorio di interesse costituiscono strumenti interpretativi in ragione della diversa sensibilità delle singole specie ai diversi inquinanti, con particolare riferimento ai principali gas fitotossici (SO₂, NO_x). La tecnica prevede protocolli standardizzati e riconosciuti da ISPRA a livello nazionale (ANPA, 2001), e tutt'ora in fase di normazione in sede europea (CEN WG31/TC264). Mediante una strategia di campionamento stratificato-randomizzata, basata su 4 strati di campionamento identificati da macrocategorie di uso del suolo, sono state identificate 57 stazioni potenzialmente rilevabili, ripartite nei diversi strati proporzionalmente alla loro superficie di copertura. L'effettiva campionabilità delle stazioni dovrà essere verificata durante la fase gestionale del monitoraggio. In caso di assenza dei requisiti prescritti in una o più stazioni, queste potranno essere sostituite utilizzando la lista delle stazioni aggiuntive. In ciascuna stazione dovranno essere effettuati 4 rilievi di biodiversità lichenica in corrispondenza delle quattro direzioni cardinali, sul tronco di tutti gli alberi idonei, situati entro il perimetro della stazione. Ogni rilievo consiste nella lista di tutte le specie presenti in una stringa verticale di 5 quadrati di 10 cm di lato, con associata la frequenza di ogni specie nell'ambito della stringa. Il numero teorico totale di rilievi da effettuare è quindi di $57 \times 4 = 228$. Per ogni rilievo i dati vanno archiviati compilando un'apposita scheda, in cui, unitamente ai dati relativi all'albero, si riportano le frequenze delle specie rilevate. Per ogni rilievo e per ogni stazione va calcolata la Biodiversità Lichenica come specificato dal protocollo ISPRA (ANPA, 2001).

Rete con licheni epifiti autoctoni come bioaccumulatori. La tecnica fornisce misure di concentrazione di elementi in traccia in campioni di talli lichenici spontaneamente presenti nel territorio di interesse. I risultati consentono la stima del pattern di deposizione degli elementi monitorati, riferiti a periodi di tempo relativamente lunghi, corrispondenti alla crescita delle porzioni talline prelevate. Le procedure di campionamento e di determinazione analitica delle concentrazioni sono state recepite da ISPRA in forma di linee guida operative (Nimis e Bargagli, 1998). Il processo di normazione a livello nazionale è in corso di avviamento presso l'Ente Nazionale di Unificazione (UNI). L'applicabilità di tale tecnica nel caso in oggetto è stata confermata da un sopralluogo che ha effettuato una verifica della disponibilità di materiale autoctono della specie *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. in quantità sufficiente in un numero adeguato di siti idonei al prelievo. La localizzazione delle stazioni di bioaccumulo avverrà per quanto possibile in corrispondenza, o nel sito più immediatamente prossimo entro il medesimo strato di campionamento, a quelle selezionate per la bioindicazione. Per fornire una valutazione della precisione delle osservazioni si ricorrerà a uno studio della variabilità delle concentrazioni degli elementi a livello intra-stazione. A tale scopo sono identificate a priori due stazioni per ciascuno strato di campionamento disposte a distanza differente dalla sorgente putativa, lungo le direttrici di diffusione principali. In ciascuna stazione si verranno effettuate analisi elementari su 4 aliquote del materiale prelevato, costituenti altrettante repliche per ciascun elemento e per il medesimo sito. Per poter valutare il grado di contaminazione di origine terrigena dei campioni lichenici, si effettueranno analisi dei medesimi elementi in traccia in campioni di suolo prelevati in corrispondenza di ciascun sito di asporto dei talli lichenici, applicando un protocollo di prelievo descritto nel progetto di dettaglio (allegato I).

Rete con i licheni epifiti alloctoni come bioaccumulatori. La tecnica fornisce misure di concentrazione di elementi in traccia in campioni di talli lichenici appositamente trapiantati nel territorio di interesse. I talli lichenici vengono prelevati in località remote non soggette a noti fenomeni di contaminazione ed esposti nelle stazioni di monitoraggio per periodi di tempo predeterminati.

Rispetto all'utilizzo di licheni autoctoni questa metodica risolve alcuni limiti operativi, inclusa la dislocazione delle stazioni di esposizione, che può essere pianificata in funzione del contesto specifico di applicazione. Inoltre è possibile seguire con precisione le dinamiche delle deposizioni, selezionando opportunamente la cadenza temporale e la durata dei periodi espositivi. Le applicazioni che utilizzano i trapianti lichenici possono quindi essere ripetute con elevata frequenza temporale (mensile, stagionale, semestrale, ecc.), e sono particolarmente indicate in caso di studi ex-post. Le procedure metodologiche sono del tutto analoghe a quelle illustrate per i licheni autoctoni limitatamente alla fase di determinazione analitica degli elementi in traccia, già recepita in sede di standardizzazione (Nimis & Bargagli, 1998).

Riguardo alla fase di raccolta ed esposizione dei campioni, le procedure sono ancora in fase di standardizzazione, ma la letteratura scientifica sull'argomento è storicamente vasta e documenta numerose esperienze in diversi contesti territoriali (per una review nazionale v. Loppi, 2006). Si ricorrerà all'esposizione di materiale monospecifico di *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* o, in alternativa, di *Evernia prunastri* L. (Ach.). La scelta dell'una o dell'altra specie viene demandata alla fase gestionale del monitoraggio, in relazione alle esigenze organizzative dei soggetti esecutori, riguardo alla reperibilità, preparazione ed esposizione dei campioni. I campioni dovranno essere esposti lungo 3 transetti due dei quali disposti sulle direttrici principali di diffusione delle emissioni, ed uno, di controllo, lungo una direzione potenzialmente non soggetta, tutti centrati sulla sorgente putativa. La definizione dei transetti è stata predisposta utilizzando sia i risultati della modellistica diffusionale, sia le serie storiche dei dati anemometrici rilevati a terra, riferiti alla stagionalità di esposizione dei campioni. Si prevede l'allestimento di 6 stazioni per ciascun transetto, localizzate a distanza crescente dalla sorgente putativa entro un raggio massimo di 20 km, costituite da appositi espositori, sui quali fissare i talli lichenici ad un'altezza di quattro metri dal suolo, per evitare eventuale contaminazione derivante da sollevamento di polveri terrigene. Riguardo alla stima della possibile contaminazione terrigena durante il periodo di esposizione, si prevede di effettuare l'analisi di campioni di suolo prelevati in corrispondenza di ciascuna stazione, in analogia a quanto riportato per il bioaccumulo con licheni autoctoni. Il piano di campionamento dovrà essere integrato con misure effettuate su 12 campioni di materiale biologico non esposto in campo, per valutare il grado di contaminazione preesistente nella matrice biologica utilizzata per le singole esposizioni. Per quanto riguarda la qualità delle misure, e la valutazione del rapporto tra le concentrazioni degli elementi in aria e nei campioni esposti, si ricorrerà all'utilizzo di un numero aggiuntivo di stazioni di bioaccumulo attivo, in corrispondenza alle postazioni di misura strumentale previste dal piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, la cui localizzazione verrà concordata durante la fase di gestione del monitoraggio. Per valutare la precisione delle osservazioni effettuate sui campioni biologici, si effettuerà uno studio della variabilità locale a livello di singola stazione, basato sull'effettuazione di misure analitiche replicate su 4 campioni nell'ambito della stessa stazione. Per descrivere le dinamiche temporali di deposizione ed accumulo, si attuerà l'esposizione dei campioni per due periodi non consecutivi di 3 mesi ciascuno, identificati in base alle dinamiche climatiche mensili, corrispondenti ai periodi giugno-agosto e dicembre-febbraio.

In generale, l'elaborazione dei dati prevede tecniche di statistica descrittiva, analisi della varianza, analisi multivariata (classificazione ed ordinamento) e cartografia computerizzata.

Per tutti gli studi i risultati della prima campagna dovranno essere considerati non solo ai fini del monitoraggio, ma anche come riferimento per la valutazione della qualità del dato, in termini di livello di precisione delle stime, dipendenti dal numero e dallo schema di posizionamento delle stazioni di monitoraggio. Durante la fase gestionale dovranno essere specificati i valori relativi al livello di probabilità e al corrispondente intervallo di confidenza dei parametri di interesse di ciascuna tecnica applicativa. Per le campagne successive alla prima, tali valori dovranno essere confrontati con i risultati

ottenuti nelle prime campagne. Queste verranno pertanto considerate vere e propri studi pilota, ai fini dell'ottimizzazione delle reti di monitoraggio per le attività successive.

Per quanto riguarda il piano temporale di gestione del sistema di biomonitoraggio della qualità dell'aria si propone quanto segue:

Rete con i licheni epifiti come bioindicatori - a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione si prevede un totale di 4 campagne di rilievi da effettuare nell'arco di 10 anni (1 campagna di rilievi ogni 3 anni),

Rete con licheni epifiti autoctoni come bioaccumulatori - come per la rete di bioindicazione, si prevede un totale di 4 campagne di prelievi da effettuare nell'arco di 10 anni (1 campagna di prelievi ogni 3 anni), a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione.

Rete con i licheni epifiti alloctoni come bioaccumulatori - si prevedono 2 campagne annuali di esposizione nei primi due anni di attività di costruzione e 5 campagne annuali di esposizione dopo l'entrata in esercizio dell'impianto termoelettrico secondo il seguente schema: 3 campagne annuali durante i primi tre anni di esercizio e 2 campagne annuali al 6° ed al 9° anno di esercizio.

In allegato I si riporta il progetto di dettaglio del sistema di biomonitoraggio prodotto dal team di esperti del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste coordinato dal prof. Mauro Tretiach.

4 BIBLIOGRAFIA

ANPA, 2001. I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. ANPA, Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, Manuali e Linee Guida 2/2001, Roma, 85 pp

CESI, 2007. CTE Porto Tolle: Analisi degli impatti su tutte le componenti ambientali a seguito degli interventi migliorativi previsti per le emissioni in atmosfera. Rapporto A7025051 rev.0, 32 pp.

Loppi S., 2006. Licheni come bioaccumulatori di elementi in traccia: stato della ricerca in Italia. *Biologia Ambientale*, 20: 69-78.

Nimis P. L., Bargagli R., 1998. Linee-guida per l'utilizzo di licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. In Piccini C., Salvati S. (Eds.): Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". ANPA, serie Atti 2/1999, Roma, pp. 279-287.

VDI 3957 Part 13: 2005-1. Biological measurement procedures for determining and evaluating the effects of ambient air pollutions on lichens (bioindication). Mapping the diversity of epiphytic lichens as indicators of air quality. VDI manual Biotechnology

VDI 3957 Part 13 Corrigendum: 2007-2. Biological measurement procedures for determining and evaluating the effects of ambient air pollutants by means of lichens (bioindication) - Mapping the diversity of epiphytic lichens as an indicator of air quality - Corrigendum concerning guideline VDI 3. VDI manual Biotechnology.

**PROGETTAZIONE DEL MONITORAGGIO BIOLOGICO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA
DEL TERRITORIO CIRCOSTANTE IL COMUNE DI PORTO TOLLE (RO).**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

Prot. B0033706 pagine 97



DIPARTIMENTO
DI SCIENZE DELLA VITA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
DIPARTIMENTO
DI SCIENZE DELLA VITA

VIA L. GIORGIERI 5, 9, 10 -
VIA E. WEISS 2 - 34127 TRIESTE (ITALY)



**PROGETTO DI MONITORAGGIO BIOLOGICO
DELLA QUALITÀ DELL'ARIA
NEL TERRITORIO CIRCOSTANTE
IL COMUNE DI PORTO TOLLE (RO)**

COMMITTENTE: CESI SPA



DIPARTIMENTO
DI SCIENZE DELLA VITA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
**DIPARTIMENTO
DI SCIENZE DELLA VITA**

VIA L. GIORGIERI 5, 9, 10 -
VIA E. WEISS 2 - 34127 TRIESTE (ITALY)

**PROGETTO DI MONITORAGGIO BIOLOGICO
DELLA QUALITÀ DELL'ARIA
NEL TERRITORIO CIRCOSTANTE
IL COMUNE DI PORTO TOLLE (RO)**

COMMITTENTE: CESI SPA

Note	versione spedita in data 03/12/2010
N. pagine	96
Data	03/12/2010
Elaborato	Fabio Candotto Carniel, Paolo Giordani, Guido Incerti
Verificato e Approvato	prof. Mauro Tretiach

**INDICE**

RELAZIONE SINTETICA E OBIETTIVI DEL PROGETTO	1
1. Caratterizzazione del territorio.....	5
2. Delimitazione del territorio di interesse per il monitoraggio.....	13
3. Individuazione dei gas/elementi in traccia da considerare e scelta degli organismi vegetali bioindicatori o bioaccumulatori	17
3.1. Bioindicazione tramite licheni epifiti.....	17
Elaborazione dei dati	33
Fase interpretativa dei dati di Bioindicazione	40
Schema temporale di esecuzione.....	44
3.2. Bioaccumulo tramite licheni epifiti autoctoni.....	45
Elaborazione dei dati	56
Interpretazione della distribuzione spaziale dei dati di bioaccumulo	69
Schema temporale di esecuzione.....	72
3.3. Bioaccumulo tramite Trapianti di licheni epifiti.....	73
Elaborazione dei dati	85
Schema temporale di esecuzione.....	89
4. Bibliografia.....	90



RELAZIONE SINTETICA E OBIETTIVI DEL PROGETTO

Viene progettato, su committenza di CESI SpA (d'ora in poi citato come Committente) un piano di monitoraggio biologico atto ad evidenziare gli effetti di eventuali alterazioni su organismi sensibili, prodotti dalle emissioni della centrale termoelettrica "Polesine Camerini" di Porto Tolle (d'ora in poi citata come CTE) in seguito alla prevista conversione a carbone/biomassa di 3 delle 4 sezioni da 660 MWe esistenti.

Il piano è corredato dalla caratterizzazione del territorio e dalla cartografia sinottica in formato numerico digitale. La caratterizzazione del territorio oggetto di studio è stata sviluppata principalmente sulla base dei dati già disponibili forniti dal Committente, che derivano dallo studio di impatto ambientale e dalla valutazione di incidenza relativi alla procedura di autorizzazione per la realizzazione e l'esercizio dell'impianto. Queste informazioni sono state integrate tramite sopralluogo speditivo, effettuato in data 13/10/2009.

Il territorio di interesse per il monitoraggio è stato delimitato sulla base delle informazioni reperite in sede di caratterizzazione e su quelle relative alle modellazioni delle emissioni gassose dell'impianto, ai dati pregressi disponibili e alle altre attività antropiche presenti, ed identificato con il dominio di applicazione dello Studio di Impatto Ambientale (SIA) fornito dal Committente. Esso ricopre un'area di 24 x 25 km. Dei 600 km² considerati, le terre emerse e i corpi idrici non marini occupano circa 463 km². Il territorio, ove si collocano centri urbani e industriali a bassa densità abitativa (17.3 km²), ha vocazione principalmente agricola (262.7 km²). La vegetazione naturale occupa circa 15.2 km², mentre ben più ampia, data la realtà fluviale del territorio, è la porzione interessata da zone umide (72.4 km²) e ancor più cospicua quella occupata da corpi idrici (95.3 km²). Il territorio rientra nell'ambito del Parco Regionale del Delta del Po nel cui interno sono presenti numerose aree protette in zone di particolare pregio naturalistico (SIC e ZPS). Dal punto di vista amministrativo l'area interessa il territorio delle regioni Veneto ed Emilia-Romagna, rispettivamente per le province di Rovigo (comuni di Porto Tolle, Porto Viro, Rosolina e Taglio di Po) e di Ferrara (comuni di Goro e Mesola).

Il piano di biomonitoraggio realizzato per l'area di studio prevede l'utilizzo di tecniche applicative basate su organismi vegetali autoctoni ed alloctoni, individuate in base agli inquinanti monitorabili. Si prescrive l'applicazione di tecniche di bioindicazione, basate su organismi sensibili a gas fitotossici quali biossido di zolfo, ossidi di azoto, ozono troposferico, e tecniche di bioaccumulo per i seguenti elementi: Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Zn, V.

La scelta degli organismi vegetali con capacità di bioindicazione o di bioaccumulo è stata effettuata valutando: a) la disponibilità di metodi già normati a livello nazionale o internazionale, b) la loro applicabilità al contesto territoriale di riferimento, soprattutto riguardo ai biomonitori autoctoni, c) la disponibilità di dati storici, relativi all'area di studio, che permettono un confronto con la situazione pregressa. Sono stati selezionati:

- 1) Licheni epifiti come bioindicatori. La tecnica fornisce stime sintetiche degli effetti sinergici degli inquinanti atmosferici sulle comunità licheniche epifite. I risultati consistono in indici statistici di diversità biologica e misure di abbondanza delle singole specie licheniche riferite alle stazioni di rilevamento. I dati vengono utilizzati per la produzione di modelli geostatistici di distribuzione della diversità lichenica, in forma cartografica, correlata agli effetti sinergici degli inquinanti. Il pattern di distribuzione delle diverse specie nel territorio di interesse



costituiscono strumenti interpretativi in ragione della diversa sensibilità delle singole specie ai diversi inquinanti, con particolare riferimento ai principali gas fitotossici (SO_2 , NO_x). La tecnica prevede protocolli standardizzati e riconosciuti da ISPRA a livello nazionale (ISPRA (ANPA, 2001), e tutt'ora in fase di normazione in sede europea (CEN WG31/TC264). Mediante una strategia di campionamento stratificato-randomizzata, basata su 4 strati di campionamento identificati da macrocategorie di uso del suolo, sono state identificate 57 stazioni, ripartite nei diversi strati proporzionalmente alla loro superficie di copertura. L'effettiva campionabilità delle stazioni dovrà essere verificata durante la fase gestionale del monitoraggio. In caso di assenza dei requisiti prescritti in una o più stazioni, queste potranno essere sostituite utilizzando la lista delle stazioni aggiuntive, fornita ad integrazione del presente documento. In ciascuna stazione dovranno essere effettuati 4 rilievi di biodiversità lichenica in corrispondenza delle quattro direzioni cardinali, sul tronco di tutti gli alberi idonei (minimo teorico 3 alberi), situati entro il perimetro della stazione. Ogni rilievo consiste nella lista di tutte le specie presenti in una stringa verticale di 5 quadrati di 10 cm di lato, con associata la frequenza di ogni specie nell'ambito della stringa. Il numero totale potenziale di rilievi da effettuare è quindi di $57 \text{ UC} \times 3 \text{ alberi} \times 4 \text{ rilievi} = 684$. Per ogni rilievo i dati vanno archiviati compilando un'apposita scheda, in cui, unitamente ai dati relativi all'albero, si riportano le frequenze delle specie rilevate. Per ogni rilievo e per ogni stazione va calcolata la Biodiversità Lichenica come specificato dal protocollo ISPRA (ANPA, 2001).

- 2) Licheni epifiti autoctoni come bioaccumulatori. La tecnica fornisce misure di concentrazione di elementi in traccia in campioni di talli lichenici spontaneamente presenti nel territorio di interesse. I risultati consentono la stima del pattern di deposizione degli elementi monitorati, riferiti a periodi di tempo relativamente lunghi, corrispondenti alla crescita delle porzioni talline prelevate. Le procedure di campionamento e di determinazione analitica delle concentrazioni sono state recepite da ISPRA in forma di linee guida operative (Nimis e Bargagli, 1998). Il processo di normazione a livello nazionale è in corso di avviamento presso l'Ente Nazionale di Unificazione (UNI). L'applicabilità di tale tecnica, nel caso in oggetto è stata confermata dopo sopralluogo in data 13/10/2009, in seguito alla verifica della disponibilità di materiale autoctono della specie *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. in quantità sufficiente in un numero adeguato di siti idonei al prelievo. Si prescrive la localizzazione delle stazioni di bioaccumulo in corrispondenza, o nel sito più immediatamente prossimo entro il medesimo strato di campionamento, a quelle selezionate per la bioindicazione. Per fornire una valutazione della precisione delle osservazioni si prescrive uno studio della variabilità delle concentrazioni degli elementi a livello intra-stazione. A tale scopo dal set di stazioni selezionate per la bioindicazione, ne sono state identificate a priori due per ciascuno strato di campionamento e disposte a distanza differente dalla sorgente putativa, lungo le direttrici di diffusione principali. In ciascuna stazione si prescrivono analisi elementari su 4 aliquote del materiale prelevato, costituenti altrettante repliche per ciascun elemento e per il medesimo sito. Per poter valutare il grado di contaminazione di origine terrigena dei campioni lichenici, si prescrivono analisi dei medesimi elementi in traccia in campioni di suolo prelevati in corrispondenza di ciascun sito di asporto dei talli lichenici, applicando protocolli di prelievo di riferimento concordati col Committente.
- 3) Licheni epifiti alloctoni come bioaccumulatori. La tecnica fornisce misure di concentrazione di elementi in traccia in campioni di talli lichenici appositamente trapiantati nel territorio di interesse. I talli lichenici vengono prelevati in località remote non soggette a noti fenomeni di contaminazione ed esposti nelle stazioni di monitoraggio per periodi di tempo predeterminati. Rispetto all'utilizzo di licheni autoctoni questa metodica risolve alcuni limiti operativi, inclusa la dislocazione delle stazioni di esposizione, che può essere pianificata in funzione del contesto specifico di applicazione. Inoltre è possibile seguire con precisione le dinamiche delle



deposizioni, selezionando opportunamente la cadenza temporale e la durata dei periodi espositivi. Le applicazioni che utilizzano i trapianti lichenici possono quindi essere ripetute con elevata frequenza temporale (stagionale, semestrale, ecc.), e sono particolarmente indicate in caso di studi ex-post. Le procedure metodologiche sono del tutto analoghe a quelle illustrate per i licheni autoctoni limitatamente alla fase di determinazione analitica degli elementi in traccia, già recepita in sede di standardizzazione (Nimis & Bargagli, 1998). Riguardo alla fase di raccolta ed esposizione dei campioni, le procedure sono ancora in fase di standardizzazione, ma la letteratura scientifica sull'argomento è storicamente vasta e documenta numerose esperienze in diversi contesti territoriali (per una review nazionale v. Loppi, 2006). Si prescrive l'esposizione di materiale monospecifico di *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf var. *furfuracea* o, in alternativa, di *Evernia prunastri* L. (Ach.). La scelta dell'una o dell'altra specie viene demandata alla fase gestionale del monitoraggio, in relazione alle esigenze organizzative dei soggetti esecutori, riguardo alla reperibilità, preparazione ed esposizione dei campioni. I campioni dovranno essere esposti lungo 3 transetti disposti sulle direzioni prevalenti dei venti nelle diverse stagioni, centrati sulla sorgente putativa. La definizione dei transetti è stata predisposta utilizzando sia i risultati della modellistica diffusionale, sia le serie storiche dei dati anemometrici rilevati a terra, riferiti alla stagionalità di esposizione dei campioni. Si prevede l'allestimento di 6 stazioni per ciascun transetto, localizzate a distanza crescente dalla sorgente putativa entro un raggio massimo di 20 km, costituite da appositi espositori, sui quali fissare i talli lichenici ad un'altezza di quattro metri dal suolo, per evitare eventuale contaminazione derivante da sollevamento di polveri terrigene. Riguardo alla stima della possibile contaminazione terrigena durante il periodo di esposizione, si prescrive l'analisi di campioni di suolo prelevati in corrispondenza di ciascuna stazione, in analogia a quanto riportato al p.to 3. Il piano di campionamento dovrà essere integrato con misure effettuate su 12 campioni di materiale biologico non esposto in campo, per valutare il grado di contaminazione preesistente nella matrice biologica utilizzata per il monitoraggio. Per quanto riguarda la qualità delle misure, e la valutazione del rapporto tra le concentrazioni degli elementi in aria e nei campioni esposti, si prescrive l'utilizzo di un numero aggiuntivo di stazioni di bioaccumulo attivo, in corrispondenza alle postazioni di misura strumentale previste dal piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, la cui localizzazione verrà concordata durante la fase di gestione del monitoraggio. Per valutare la precisione delle osservazioni effettuate sui campioni biologici, si prescrive uno studio della variabilità locale a livello di singola stazione, basato sull'effettuazione di misure analitiche replicate su 4 campioni nell'ambito di due stazioni per ciascuno strato considerato. Per descrivere le dinamiche temporali di deposizione ed accumulo, si prescrive che nel corso di ogni campagna di bioaccumulo attivo l'esposizione dei campioni avvenga in due periodi non consecutivi di 3 mesi ciascuno, identificati in base alle dinamiche climatiche mensili, corrispondenti ai periodi giugno-agosto e dicembre-febbraio.

L'elaborazione dei dati prevede tecniche di statistica descrittiva, analisi della varianza, analisi multivariata (classificazione ed ordinamento) e cartografia computerizzata.

A fini del piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, tutti gli studi di biomonitoraggio andrebbero ripetuti secondo il seguente schema temporale:

- per la rete di biomonitoraggio con licheni epifiti come bioindicatori si prevede, a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione, un totale di quattro campagne di rilievi da effettuare nell'arco di dieci anni (una campagna di rilievi ogni tre anni);
- per la rete di biomonitoraggio con licheni epifiti autoctoni come bioaccumulatori si prevede, come per la rete di bioindicazione, un totale di quattro campagne di prelievi da



effettuare nell'arco di dieci anni (una campagna di rilievi ogni tre anni), a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione;

- per la rete di biomonitoraggio con licheni epifiti alloctoni come bioaccumulatori si prevedono due campagne annuali di esposizione nei primi due anni di attività di costruzione e cinque campagne annuali di esposizione dopo l'entrata in esercizio dell'impianto termoelettrico secondo il seguente schema: tre campagne annuali durante i primi tre anni di esercizio e due campagne annuali al 6° ed al 9° anno di esercizio.

Per tutti gli studi i risultati della prima campagna dovranno essere considerati non solo ai fini del monitoraggio, ma anche come riferimento per la valutazione della qualità del dato, in termini di livello di precisione delle stime, dipendenti dal numero e dallo schema di posizionamento delle stazioni di monitoraggio. Durante la fase gestionale dovranno essere specificati i valori relativi al livello di probabilità e al corrispondente intervallo di confidenza dei parametri di interesse di ciascuna tecnica applicativa. Per le campagne successive alla prima, tali valori dovranno essere confrontati con i risultati ottenuti nelle prime campagne. Queste verranno pertanto considerate vere e proprii studi pilota, ai fini dell'ottimizzazione delle reti di monitoraggio per le attività successive.



1. CARATTERIZZAZIONE DEL TERRITORIO

La caratterizzazione del territorio oggetto del piano di monitoraggio biologico è stata sviluppata sulla base dello Studio di Impatto Ambientale (SIA) e della Valutazione di Incidenza relativi alla procedura di autorizzazione per la realizzazione e l'esercizio della CTE. La documentazione, fornita dal Committente, è stata integrata con informazioni reperite da sopralluogo speditivo effettuato in data 13/10/2009, e con i risultati di un'analisi della cartografia dell'utilizzo del suolo di recente produzione, effettuata in ambiente GIS, basata sulla Banca Dati della Copertura del Suolo della Regione Veneto, e sulla Terza Carta dell'Uso del Suolo della Regione Emilia-Romagna.

In particolare, ai fini del monitoraggio biologico, è stata effettuata una caratterizzazione della distribuzione e frequenza delle specie vegetali e delle crittogame, ai fini della selezione degli organismi bioindicatori e bioaccumulatori e della distribuzione dei punti di rilevamento o campionamento (cfr. sezione 4).

L'area oggetto dell'indagine, dal punto di vista amministrativo, interessa il territorio delle regioni Veneto ed Emilia-Romagna, rispettivamente per le province di Rovigo (comuni di Porto Tolle, Porto Viro, Rosolina e Taglio di Po) e di Ferrara (comuni di Goro e Mesola). Il sito della CTE è situato nell'area del delta del fiume Po, sulla sponda destra del ramo del Po di Pila, in prossimità del suo sbocco in mare (Punta Maistra) (Figura 1).

Il fiume Po, nel tratto terminale del suo corso, scorre nella regione storica del Polesine segnando il confine amministrativo tra le province di Rovigo e Ferrara. Il suo ampio delta (380 km²) comprende 5 rami principali (Po di Maistra, Po della Pila, Po delle Tolle, Po di Gnocca e Po di Goro) che attraversano il territorio di pertinenza del piano di monitoraggio. Il SIA, per quanto riguarda i tratti fluviali del fiume Po, riporta le seguenti informazioni: il Po di Levante presenta le caratteristiche tipiche di un canale artificiale, con scarsa disponibilità di superfici adatte allo sviluppo di fitocenosi di tipo naturale. Si tratta di un tratto fluviale appositamente gestito per il trasporto e il passaggio di natanti commerciali con frequenti interventi antropici sulle arginature. Il Po di Venezia, che va dalla conca di Volta Grimana alla darsena della centrale e si dirama in quattro rami principali (Po di Maistra, Po della Pila, Po delle Tolle, Po di Gnocca), presenta invece numerose aree dove sono presenti habitat naturali di alveo; queste aree coincidono con le zone di sedimentazione del fiume dove la profondità dell'acqua è tale da impedire la navigazione. Generalmente, le zone navigabili per i natanti commerciali si trovano ad alcune centinaia di metri da questi habitat e dalla vegetazione ospitata.

Il delta del Po, per la sua grande valenza ambientale, è stato dichiarato patrimonio dell'umanità dall'UNESCO. Il territorio rientra nell'ambito del Parco Regionale del Delta del Po nel cui interno sono presenti numerose aree protette, in zone di particolare pregio naturalistico (SIC e ZPS). La Provincia di Rovigo è caratterizzata da numerosi piccoli centri e da un diffuso uso agricolo intensivo che limitano grandemente la presenza di ambienti naturali e reti di interconnessione ecologica di una certa complessità. In Provincia di Rovigo sono stati definiti ed individuati sei siti d'importanza comunitaria SIC per complessivi 22.740 ettari e cinque zone di protezione speciale ZPS per 12.818 ettari, localizzati quasi esclusivamente nel Basso Polesine.

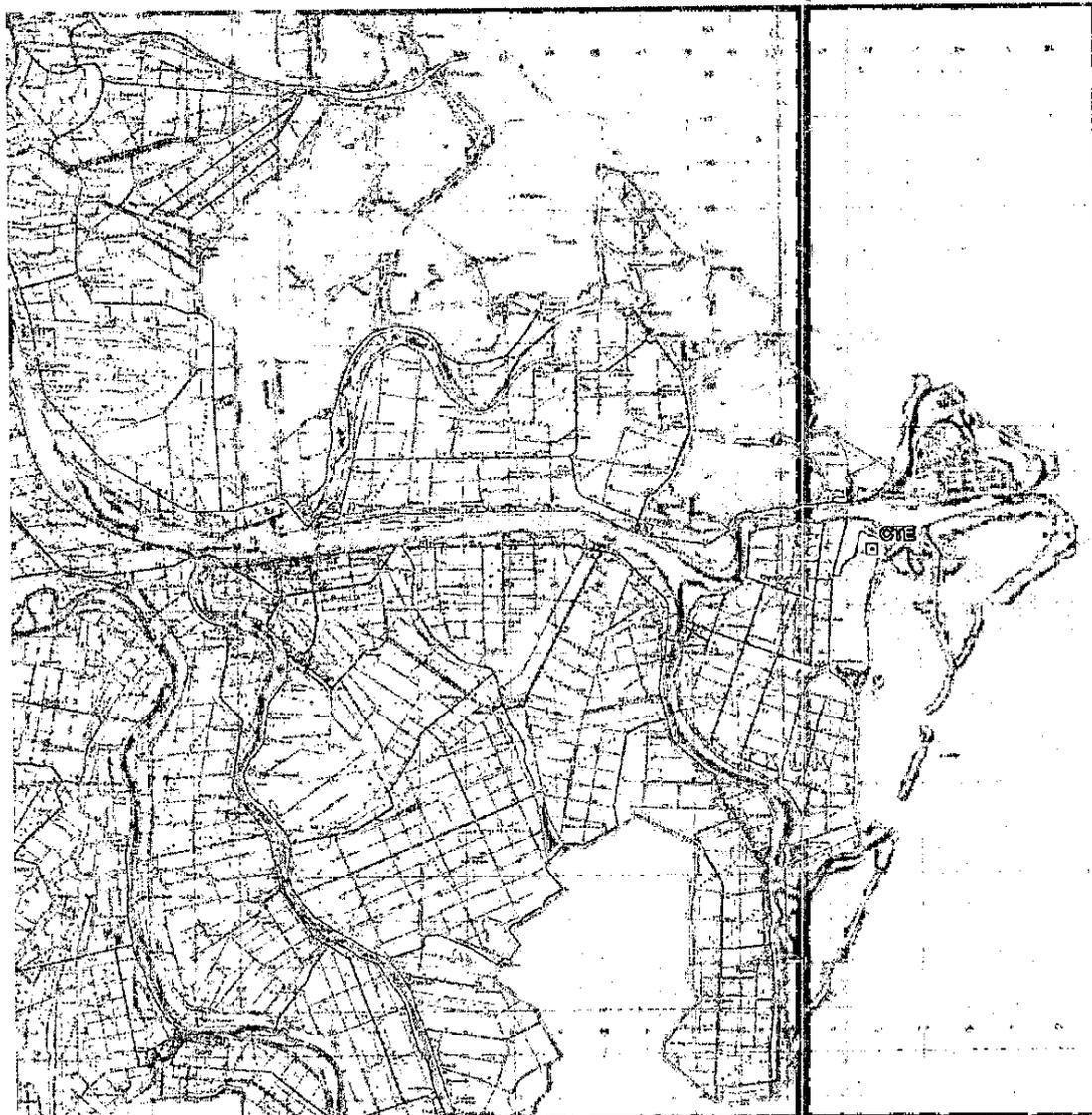


Figura 1 - Carta del delta del Po, e localizzazione della CTE (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009).

La Regione Veneto, con DGR 449/2003, ha approvato il riconoscimento del SIC denominato "Delta del Po", con numerazione IT3270017. Secondo la Valutazione di Incidenza, il sito ricomprende i SIC già denominati IT3250004, IT3270002, IT3270008, IT3270009, IT3270010, IT3270011 e IT3270012. La ZPS IT3270023 "Delta del Po" accorpa e amplia le preesistenti ZPS IT3270016 "Delta del Po: rami fluviali e scanni", IT3270018 "Valli arginate tra Adige e Po di Levante", IT3270019 "Valli arginate tra Po di Levante e Po di Maistra" e IT3270020 "Valli arginate tra Po di Maistra e Po di Venezia".

L'area del Delta del Po comprende la parte veneta del delta, tra la foce dell'Adige a Nord e quella del Po di Goro a Sud, per complessivi 24513 ha. Gli ambienti caratterizzanti sono:

- valli da pesca, arginate con acque salmastre e livello idrico controllato artificialmente, barene e piccoli fragmiteti (sono comprese Boccavecchia, Passerella, Morosina, Cannelle,



Spolverina, Segà, Capitania, Venier, Sagreda, Pozzatini, Canocchione, Morato, Sacchetta, Bagliona, Lago del Polesine, San Leonardo, Scannarello, Ca' Pisani, Ca' Pasta, Chiusa, Ripiego, San Carlo, Ca' Zugliani, Biotopo Bonello nei Comuni di Rosolina, Porto Viro e Porto Tolle);

- le lagune con acque salate e apporti di acqua dolce dai rami fluviali del Po con scanni sabbiosi antistanti, barene e bonelli con fragmiteti (Laguna di Caleri, Sacca Cavallai, Vallona, Barbamarco, Isola della Batteria, Bosson, Canarin, Allagamento Saccagna, Sacca di Scardovari e Bottoniera, Bonello Bacucco nei Comuni di Rosolina, Porto Viro e Porto Tolle);
- i rami fluviali del Po (Po di Goro, Po della Donzella, Po di Gnocca, Po di Venezia, Po delle Tolle, Po della Pila, Po di Maistra, Po di Levante) con golene e isole fluviali, bosco idrofilo e fragmiteto;
- il bacino Ca' Mello, acqua dolce e fragmiteti, relitto di valle Boccata-Canalino.

L'insieme deltizio fluviale, di notevoli dimensioni e portata, è caratterizzato da sistemi dunali costieri, zone umide vallive, formazioni sabbiose (scanni) e isole fluviali con golene e lanche, con associazioni vegetali psammofile e, limitatamente ad alcune aree, lembi relitti di foreste. Il clima è di tipo temperato con estate calda e secca. I valori della temperatura considerati nella varie stagioni e nelle medie fanno rientrare il Delta del Po, secondo la classificazione fitoclimatica Mayr-Pavari, nella zona del "Castanetum caldo" avvicinandolo al clima della pianura padana. Tale situazione è modificata nella zona litoranea che per le particolari condizioni climatiche (temperature del mese più freddo più elevate) rientra nella zona del "Lauretum". Le precipitazioni costituiscono la maggiore fonte di approvvigionamento idrico soprattutto nella fascia litoranea, dove non si hanno importanti apporti esogeni d'acqua e il terreno è scarsamente idoneo a trattenere quella meteorica.

L'umidità relativa presenta il tipico andamento giornaliero raggiungendo i massimi valori nelle ore immediatamente prima dell'alba e i minimi nel primo pomeriggio, a seguito del forte riscaldamento diurno. I valori medi annui variano attorno al 70-75%. Per quanto concerne i venti, l'andamento stagionale presenta in primavera una dominanza dello Scirocco da SE e, in autunno e inverno, la predominanza di quelli da NE (Bora).

L'ambito costituito dai rami fluviali del Po ospita boschi igrofilo di *Salicion albae*. Nelle golene sono presenti praterie galleggianti di *Trapa natans*. Le singolari formazioni sabbiose alle foci, sui margini delle lagune, sono colonizzate da vegetazione psammofila e alofila. La parte valliva è caratterizzata dalla presenza di un complesso sistema di canneti, barene, canali e paludi con ampie porzioni utilizzate prevalentemente per l'allevamento del pesce. Il paesaggio naturale è caratterizzato da spazi d'acqua libera con vegetazione macrofita sommersa e da ampi isolotti piatti che ospitano tipi alofili. La rilevanza per l'avifauna è paragonabile a quella della Laguna di Venezia, e le valli da pesca stanno assumendo un'importanza sempre maggiore come siti di nidificazione in quanto ambiti relativamente stabili. La scheda identificativa del SIC individua la presenza di 22 specie avicole incluse nelle direttive Habitat (79/409/CEE e 92/43/CEE), tra cui alcune popolazioni assumono la valutazione di eccellenza. Tra anfibi e rettili nell'area viene evidenziata la presenza di una popolazione di *Emys orbicularis* indicizzata al valore "buono", mentre riguardo la fauna ittica 6 popolazioni ricevono indici elevati. Riguardo alla conservazione floristica, le popolazioni di *Salicornia veneta* Pign. et Lausi (*Amaranthaceae*) e di *Kosteletzkya pentacarpos* (L.) Ledeb (*Malvaceae*) ospitate dal SIC rientrano nella direttiva Habitat, mentre altre 31 specie sono comprese nell'elenco del Libro Rosso Nazionale e nelle convenzioni internazionali tra le "Specie animali e vegetali di interesse comunitario che richiedono una

protezione rigorosa" (Direttiva 97/62/CEE): *Aceras anthropophorum*, *Caltha palustris*, *Centaurea tommasinii*, *Cephalanthera longifolia*, *Cicindela majalis*, *Cladium mariscus*, *Cylindera trisignata*, *Hydrocotyle vulgaris*, *Lathyrus palustris*, *Leersia oryzoides*, *Leucocjum aestivum*, *Linum maritimum*, *Loroglossum hircinum*, *Orchis mario*, *Orchis purpurea*, *Phillyrea angustifolia*, *Plantago cornuti*, *Plantago crassifolia*, *Quercus ilex*, *Salicornia patula*, *Salvinia natans*, *Senecio paludosus*, *Spartina maritima*, *Suncus etruscus*, *Trachomitum venetum*, *Trapa natans*, *Pyricantha coccinea*, *Ophrys sphecodes*, *Orchis simia*, *Epipactis palustris*, *Medicago marina*.

La scheda SIC individua, quali caratteristiche generali del sito, un tipo di habitat predominante, costituito da fiumi ed estuari soggetti a maree, melme, banchi di sabbia e lagune saline per una estensione del 60% della superficie. Stagni salmastri, prati salini, steppe saline per il 2% della superficie. Dune litoranee, spiagge sabbiose per il 3% della superficie, corpi d'acqua interni per il 30% della superficie. Spiagge ghiaiose, scogliere marine, isolotti per il 4% della superficie.

Per quanto riguarda la ZPS IT3270023, in gran parte sovrapposta al SIC IT3270017, la scheda Natura 2000 fornisce informazioni simili alla scheda del SIC, con la sola variazione della percentuale di copertura del sito dovuta alla differente superficie presa in considerazione.

Rispetto a quanto riportato nei documenti forniti dal Committente, ai fini del monitoraggio biologico appare di interesse verificare la diversa superficie occupata dalle tipologie di utilizzo del suolo nell'ambito del territorio di indagine. Di seguito si riporta la carta di uso del suolo derivante dall'integrazione delle banche dato delle Regioni Veneto ed Emilia-Romagna (Figura 2), relativa all'area di pertinenza del SIA. Entrambe le fonti utilizzano il codice di nomenclatura Corine Land Cover, sebbene ad un livello di dettaglio differente, derivante dalla diversa scala di acquisizione del dato di copertura (1:10.000 per il Veneto, 1:25.000 per l'Emilia-Romagna). Inoltre, dato il diverso anno di edizione delle due fonti (2006 per il Veneto, 2003 per l'Emilia-Romagna), la corrispondenza tra il codice Corine e la descrizione in legenda non è sempre coincidente tra le due fonti. Pertanto, nell'integrazione dei due dataset, il livello di dettaglio prodotto è diversificato in relazione alla localizzazione geografica dei dati di base.

L'area di pertinenza del SIA ricopre un'area di 24 x 25 km. Dei 600 km² considerati, le terre emerse ed i corpi idrici non marini occupano circa 463 km². Il territorio, ove si collocano centri urbani e industriali a bassa densità abitativa (17.3 km²), ha vocazione principalmente agricola (262.7 km²). La vegetazione naturale occupa circa 15.2 km², mentre ben più ampia, data la realtà fluviale del territorio, è la porzione interessata da zone umide (72.4 km²) e ancor più cospicua quella occupata da corpi idrici (95.3 km²) (Tabella 1). Il dettaglio della superficie coperta dalle diverse classi di utilizzo del suolo è riportato in Tabella 2.

Tabella 1 - Classi Corine Landcover livello 1 e area di copertura nell'ambito del territorio di pertinenza del SIA

Corine Livello 1	Legenda	Area (ha)
1	Aree artificiali	1732
2	Aree agricole	26270
3	Foreste e aree seminaturali	1515
4	Zone umide	7239
5	Corpi idrici	9528
Totale	Terre e corpi idrici non marini	46286

Tabella 2 - Classi Corine landcover al massimo livello di dettaglio disponibile e area di copertura, relative a: aree artificiali (A), aree agricole (B), foreste e aree semi-naturali (C), zone umide (D) e corpi idrici (E).

Tab.2A) Aree artificiali		
Cod. Corine	Legenda	Area (ha)
1.1.1.2	Tessuto urbano continuo rado	56
1.1.2	Tessuto urbano discontinuo	42
1.1.2.1	Tessuto urbano discontinuo denso con uso misto (Sup. Art. 50%-80%)	150
1.1.2.2	Tessuto urbano discontinuo medio, principalmente residenziale (Sup. Art. 30%-50%)	157
1.1.2.3	Tessuto urbano discontinuo rado, principalmente residenziale (Sup. Art. 10%-30%)	46
1.1.3	Classi di tessuto urbano speciali	2
1.1.3.1	Complessi residenziali comprensivi di area verde	4
1.1.3.2	Strutture residenziali isolate	274
1.2.1	Aree industriali, commerciali e dei servizi pubblici e privati	8
1.2.1.1	Aree destinate ad attività industriali	328
1.2.1.3	Aree destinate a servizi pubblici, militari e privati	11
1.2.1.4	Infrastrutture di supporto alle acque, barriere frangiflutti, dighe	2
1.2.2.2	Rete stradale secondaria con territori associati	462
1.2.3	Aree portuali	59
1.3.2	Discariche	11
1.3.3	Aree in costruzione	17
1.3.4	Aree in attesa di una destinazione d'uso	26
1.4.1	Aree verdi urbane	35
1.4.2	Aree destinate ad attività sportive ricreative	42
Totale livello 1		1732

**Tab. 2C) Foreste e aree seminaturali**

Cod. Corine	Legenda	Area (ha)
3.1.1	Boschi di latifoglie	70
3.1.1.4	Boschi planiziali a prevalenza di farnie, frassini, ecc.	553
3.1.1.5.1	Impianto di latifoglie	57
3.1.1.6.3	Saliceti e altre formazioni riparie	360
3.2.2.1.1	Arbusteti	23
3.2.3.1	Aree con vegetazione arbustiva e/o erbacea con alberi sparsi	10
3.2.4	Vegetazione in evoluzione	5
3.3.1	Spiagge, dune, sabbie	387
3.3.1.2	Vegetazione delle dune litoranee	51
Totale livello 3		1515

Tab. 2D) Zone umide

Cod. Corine	Legenda	Area (ha)
4.1.1	Ambienti umidi fluviali	261
4.1.1.1	Vegetazione a dominanza di canneti/giuncheti (zone umide fluviali)	87
4.1.2.1	Vegetazione a dominanza di canneti/giuncheti (zone umide lacuali)	2
4.1.2.2	Vegetazione caratterizzata da dominanza arboreo/arbustiva igrofila	39
4.2.1.1	Casse di colmata aperte rispetto alla laguna o al mare	270
4.2.1.3	Barene	843
4.2.1.4	Vegetazione a dominanza di canneti/giuncheti (zone umide costiere)	27
4.2.1.5	Valli da pesca	5677
4.2.3.1	Velme lagunari	31
Totale livello 4		7239

Tab. 2E) Corpi idrici

Cod. Corine	Legenda	Area (ha)
5.1.1.1	Fiumi, torrenti e fossi	2051
5.1.1.2	Canali e idrovie	380
5.1.1.3	Argini	89
5.1.1.4	Alvei di fiumi e torrenti con vegetazione abbondante	13
5.1.2.1	Bacini senza manifeste utilizzazione produttive	15
5.1.2.4	Bacini con prevalente altra destinazione produttiva	61
5.2.1.1	Canali lagunari	995
5.2.1.2	Specchi lagunari navigabili solo in condizioni di alta marea	4706
5.2.1.3	Acquaculture di acqua salmastra	319
5.2.3	Mari e Oceani	900
Totale livello 5		9528



2. DELIMITAZIONE DEL TERRITORIO DI INTERESSE PER IL MONITORAGGIO

La valutazione di incidenza e il SIA forniti dal Committente identificano l'ambito di influenza potenziale della CTE da prendere in considerazione per l'analisi delle componenti ambientali potenzialmente esposte all'impatto, che viene definito mettendo in relazione le caratteristiche morfologico-ambientali del territorio con l'estensione spaziale teoricamente attribuibile alle potenziali interferenze derivanti dalle "azioni" di progetto. L'obiettivo perseguito è dichiaratamente quello di individuare l'area massima entro la quale, secondo le conoscenze acquisite, sia possibile prevedere che gli impatti di maggior estensione si esauriscano o scendano a livelli trascurabili. L'area individuata, cioè l'ambito di sostanziale estinzione delle prevedibili interferenze ambientali viene circoscritta ad una superficie che si estende, rispetto al baricentro del complesso impiantistico, 12,5 km in direzione N, 12,5 km in direzione S, 20 km in direzione O e 4 km in direzione E (Figura 3).



Figura 3 - Carta del delta del Po (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009), localizzazione del camino della CTE, e delimitazione dell'area di pertinenza del SIA (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009)



Ai fini del piano di monitoraggio biologico, l'area di interesse è stata delimitata sulla base di quattro fattori principali:

- A) **Modellistica diffusionale.** Nell'ambito del SIA sono stati considerati prioritariamente i modelli diffusionali della CTE per i seguenti inquinanti aerodiffusi: a) principali gas fitotossici (NO_x , SO_2 , v. Figura 4) i cui effetti possono essere monitorati mediante tecniche di bioindicazione, e b) particolato sospeso e deposizioni di polveri (PTS, PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$), la cui componente in elementi in traccia, sia complessiva, sia per singolo elemento, può essere monitorata mediante tecniche di bioaccumulo.
- B) **Dati climatici.** Un ulteriore criterio di valutazione è costituito dal regime dei parametri climatici che influenzano l'effetto degli inquinanti atmosferici sugli organismi sensibili. Sono stati considerati in particolare il regime dei venti a terra, in termini di direzione e frequenza (Figura 5). I dati meteo analizzati, forniti dal Committente su concessione ARPA Veneto, sono riferiti al periodo 1998-2008 per le seguenti stazioni di rilevamento: Adria Bellombra, Pradon Porto Tolle, Rosolina Po di Tramontana, Sant'Apollinare e Villadose. Ai fini della delimitazione dell'area di interesse per il piano di monitoraggio biologico sono state preferenzialmente selezionate le stazioni di Rosolina e Porto Tolle, che ricadono entro l'ambito considerato dal SIA.
- C) **Studi pregressi.** La disponibilità di studi di biomonitoraggio pregressi nelle aree circostanti il comune di Porto Tolle ha fornito ulteriori indicazioni. Sono stati considerati i risultati di uno studio di bioindicazione e bioaccumulo tramite licheni epifiti, condotto nel 2003 (Scarselli et al., 2003). In tale studio nell'area considerata per il monitoraggio biologico veniva incluso il territorio entro un raggio di 25 km dalla CTE.
- D) **Tecniche di biomonitoraggio.** I criteri di delimitazione sono stati esplicitati anche in funzione delle tecniche di biomonitoraggio prescritte, con particolare riguardo alla disponibilità in loco di organismi autoctoni da utilizzare come biomonitors. La loro distribuzione spaziale e la loro frequenza possono infatti individuare domini territoriali di indagine diversificati in funzione dell'applicazione di tecniche diverse.

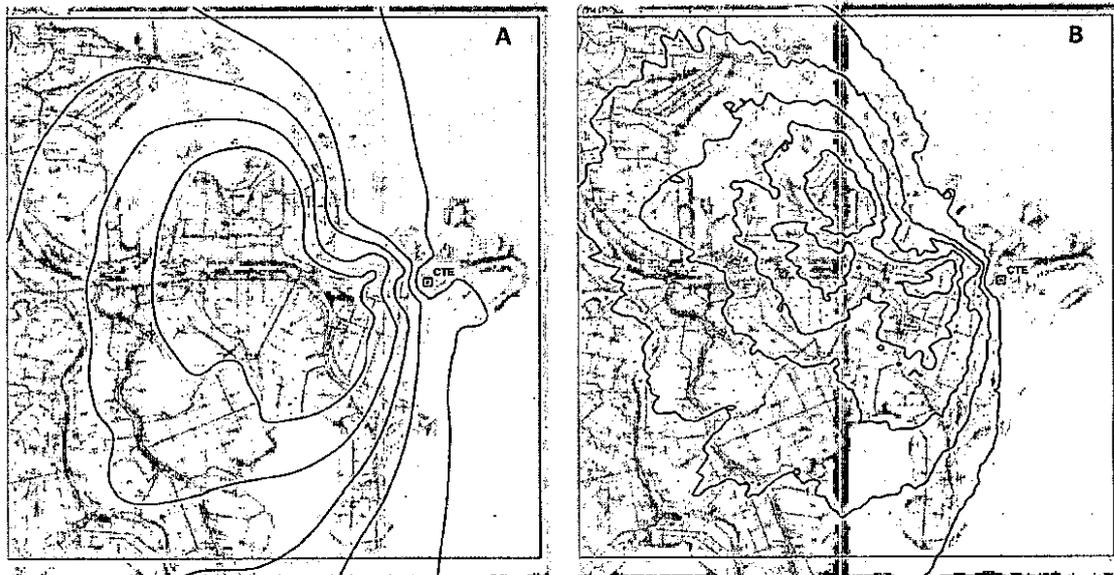


Figura 4 - Modelli diffusionali per SO_2 : isolinee di media (A) e 98° percentile (B) annuali delle concentrazioni.

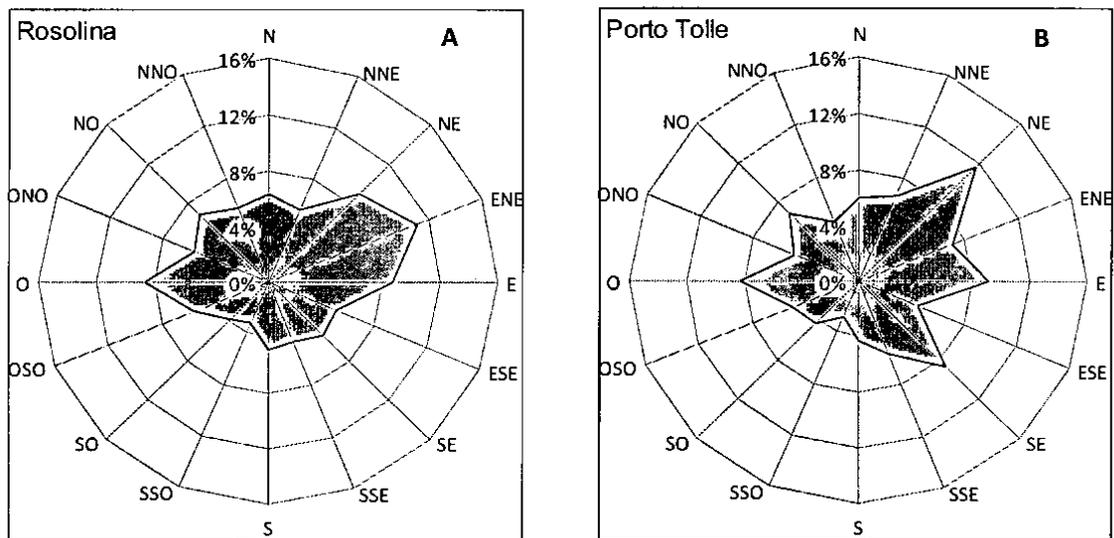


Figura 5 - Rosa dei venti delle stazioni di Pradon - Porto Tolle (A) e Rosolina - Po di Tramontana (B). I dati riportati si riferiscono a medie annuali calcolate sui dati orari per il periodo 1998-2008.

Secondo la modellistica diffusionale, viene identificata una direttrice principale di diffusione degli inquinanti. L'estensione del dominio di applicazione della modellistica, che coincide con l'area di interesse del SIA, appare appropriato anche ai fini del monitoraggio biologico, poiché include sia le zone di minima ricaduta, identificate dalle isolinee marginali di diffusione (Figura 4), sia aree potenzialmente non soggette, localizzate nel quadrante più occidentale. I dati climatici confermano queste tendenze generali, indicando tuttavia una maggior frequenza dei venti provenienti dal quadrante nord-est (Bora) rispetto al quadrante sud-est (Scirocco). Le rose dei venti (Figura 5) evidenziano inoltre una componente non trascurabile di venti da ovest, che, spirando verso il mare, confermano il settore occidentale dell'area come il meno potenzialmente impattato dalla diffusione delle emissioni della sorgente putativa. Rispetto al SIA, lo studio di biomonitoraggio del 2003 identifica un'area più estesa, soprattutto in direzione ovest rispetto alla CTE, essendo basata su un settore circolare. In questo modo, sono ricomprese in essa sia zone relativamente estese potenzialmente poco soggette alle emissioni, sulla base della modellistica diffusionale e delle rose dei venti, sia aree ai margini sud-ovest e nord-ovest potenzialmente impattate da altre fonti di emissione, come l'abitato di Rosolina, ma soprattutto la S.S. 309. L'estensione dell'area descritta nel SIA pare pertanto adatta ad evidenziare possibili fenomeni di alterazione ambientale utilizzando organismi vegetali come biomonitors, anche in considerazione della presenza diffusa, ed in quantità sufficiente, di organismi autoctoni da utilizzare come bioaccumulatori, verificata in sede di sopralluogo tecnico effettuato in data 13/10/2009 (cfr. sezione 4.2).

Sulla base dei fattori considerati e sopra descritti, l'area di interesse per il piano di monitoraggio biologico viene delimitata in base al dominio territoriale del SIA. Una minima modifica rispetto al riferimento deriva più da ragioni pratiche che scientifiche: le coordinate geografiche dei vertici dell'area, che nel SIA vengono identificate in base alla distanza dalla CTE, vengono qui arrotondate alle coordinate metriche del sistema di proiezione cartografica European Datum 1950 Fuso 33 Nord, secondo la Tabella 3. Tale procedura definisce infatti in maniera inequivocabile un'area di 24 x 25 km, mediante la specificazione di posizioni geografiche esatte.



Tabella 3 - Coordinate cartografiche dei vertici del territorio di interesse per il piano di monitoraggio biologico, nel sistema di proiezione European Datum 1950 Fuso 33 Nord.

Vertice	UTM Est	UTM Nord
NE	307000	4993500
NO	283000	4993500
SE	307000	4968500
SO	283000	4968500



3. INDIVIDUAZIONE DEI GAS/ELEMENTI IN TRACCIA DA CONSIDERARE E SCELTA DEGLI ORGANISMI VEGETALI BIOINDICATORI O BIOACCUMULATORI

Il piano di biomonitoraggio realizzato per l'area di studio prevede l'utilizzo di tecniche applicative basate su organismi sia spontaneamente presenti nell'area di studio (autoctoni) sia appositamente trapiantati (alloctoni), individuate in base agli inquinanti monitorabili. Tra i diversi biomonitoraggi considerati, sono stati prioritariamente scelti organismi il cui utilizzo è già stato protocollato con procedure recepite da enti di normazione o di riferimento in ambito scientifico. Si prescrive l'applicazione di tecniche di bioindicazione, basate su organismi sensibili a gas fitotossici quali biossido di zolfo, ossidi di azoto, ozono troposferico, e tecniche di bioaccumulo per i seguenti elementi: Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Zn, V.

Riguardo alla bioindicazione, è stata privilegiata la tecnica che permette di stimare gli effetti sinergici della composizione dell'atmosfera a livello di specie e comunità. Si prescrivono le procedure da seguire per evidenziare sia il ruolo di specifiche sostanze inquinanti, valutando ad esempio il ruolo di specie indicatrici nell'ambito delle comunità biologiche monitorate, sia gli effetti sinergici, fornendo i riferimenti metodologici per l'elaborazione di dati sintetici.

Riguardo alle tecniche di bioaccumulo, che misurano concentrazioni di determinati elementi e composti in campioni biologici, oltre agli elementi da analizzare, vengono esplicitamente menzionati i protocolli sperimentali di misura, ed i limiti di precisione e di rilevabilità richiesti per ciascun elemento. Viene inoltre prescritta l'analisi di possibili elementi indicatori della contaminazione dei campioni biologici in relazione a fonti di origine naturali (contaminazione terrigena).

3.1. BIOINDICAZIONE TRAMITE LICHENI EPIFITI.

Questa tecnica fornisce stime sintetiche degli effetti sinergici degli inquinanti atmosferici sulle comunità licheniche epifite. I risultati consistono in indici statistici di diversità biologica e misure di abbondanza delle singole specie licheniche riferite alle stazioni di rilevamento. Tali dati vengono utilizzati per la produzione di modelli geostatistici di distribuzione della diversità lichenica, in forma cartografica, correlata agli effetti sinergici degli inquinanti. Il pattern di distribuzione delle diverse specie nel territorio di interesse costituiscono strumenti interpretativi in ragione della diversa sensibilità delle singole specie ai diversi inquinanti, con particolare riferimento ai principali gas fitotossici (SO_2 , NO_x). Data la lenta velocità di crescita dei talli lichenici, la tecnica consente di apprezzare le dinamiche temporali di sviluppo delle comunità solo a distanza di tempo relativamente lunga tra campagne di monitoraggio successive, ed è quindi indicata una ripetizione dello studio ad intervalli almeno quadriennali. L'inclusione nel piano di monitoraggio è basata su diverse considerazioni. In primo luogo la tecnica prevede protocolli standardizzati e riconosciuti da ISPRA (ex APAT, ex ANPA) a livello nazionale, ed è tutt'ora in fase di normazione in sede europea (CEN WG31/TC264), sulla base del protocollo standardizzato in Italia (ANPA, 2001) e delle linee guida VDI tedesche (VDI, 2005).

L'esistenza di dati pregressi per l'area di indagine fornisce ulteriore supporto sia per la pianificazione del monitoraggio sia, in termini prospettici, per un confronto sugli esiti della fase gestionale. Da un'analisi preliminare dello studio di bioindicazione tramite licheni epifiti condotto nel 2003 (Scarselli et al., 2003), e da un sopralluogo tecnico eseguito in situ in data 13/10/2009, è emersa la difficoltà di applicare pedissequamente il protocollo operativo ISPRA (ANPA, 2001), per la sezione relativa alla localizzazione sul territorio delle stazioni (unità di campionamento). Essa infatti prevede una strategia di campionamento sistematico basato su grigliato chilometrico. Sono stati effettuati test



di campionabilità seguendo il protocollo, verificando la localizzazione delle stazioni dello studio del 2003 (Figura 6) entro unità di campionamento (UC) identificate secondo diverse soluzioni di grigliato (Tabella 4), in termini di dimensioni e spaziatura delle unità di campionamento.

I test hanno evidenziato come, indipendentemente dalla geometria del grigliato, gran parte delle stazioni del 2003 non fossero incluse nel campione sistematico di UC. Inoltre, data la distribuzione disomogenea dei siti idonei, le UC effettivamente campionabili includerebbero più siti, e, vista la coincidenza tra stazione e UC prevista dal protocollo, si otterrebbe una riduzione del numero di stazioni sul territorio, rispetto a quanto proposto nello studio del 2003. Infine, le dimensioni delle UC localizzate lungo un grigliato costituirebbero un'ulteriore fattore restrittivo per l'applicazione del protocollo: le dimensioni raccomandate nel protocollo (500-1000 m di lato) favorirebbero l'inclusione nella medesima UC di siti idonei al campionamento ma sottoposti a condizioni ecologiche notevolmente diverse, in termini di fattori di pressione locali (e.g. uso del suolo, vicinanza delle strade, ecc.). D'altro canto ridurre le dimensioni delle unità di campionamento, data la disomogeneità della distribuzione dei siti idonei al campionamento, diminuirebbe ulteriormente la probabilità di localizzarli entro il perimetro delle UC.

Pertanto, in deroga al protocollo ISPRA (ANPA, 2001) si prescrive di escludere la selezione delle stazioni tramite l'applicazione di un piano di campionamento sistematico, che potrebbe comportare l'ottenimento di un campione numericamente esiguo e conseguentemente i risultati sarebbero affetti da una ridotta rappresentatività statistica.

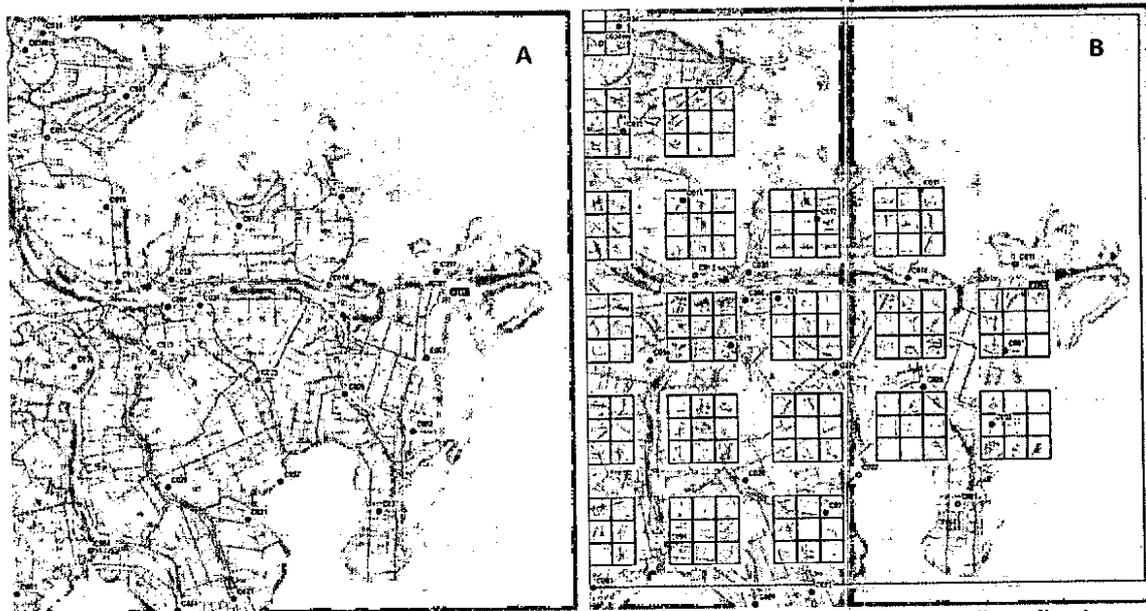


Figura 6 - Localizzazione delle stazioni di bioindicazione nello studio del 2003 (A) e test di applicazione del protocollo ISPRA (ANPA, 2001) utilizzando UC di 1x1 km lungo un grigliato a maglia 4.5 km (B) (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009).



Tabella 4 - Risultati dei test di applicabilità del protocollo ISPRA (APAT, 2001) considerando la localizzazione delle stazioni dello studio 2003, diverse geometrie di grigliato e l'eventuale sostituzione delle UC, prevista dal protocollo. Lo sforzo di campionamento richiesto da ciascuna configurazione è calcolato come l'area del territorio da esplorare complessivamente (numero di UC x superficie unitaria x numero di sostituzioni) espressa in percentuale sull'area del territorio di interesse.

Dimensioni UC (km)	Dimensioni grigliato (km)	Numero UC	Numero siti 2003 entro UC		Sforzo di campionamento
			non sostituite	sostituite	
1 x 1	6	16	-	10	30%
0.5 x 0.5	6	17	-	2	8%
1 x 1	4.5	20	1	11	37%
0.5 x 0.5	4.5	20	-	2	9%
0.5 x 0.5	3	48	1	8	22%
0.5 x 0.5	2	116	8	19	53%

Indipendentemente dalla delimitazione dell'area di interesse, la dislocazione sul territorio dei siti di rilevamento deve essere basata su strategie di campionamento probabilistiche. Esistono diversi possibili disegni di campionamento, e la scelta del più efficace dipende ovviamente dalla natura e distribuzione spaziale della popolazione di riferimento da cui estrarre il campione (e.g. licheni su alberi distribuiti in maniera più o meno regolare sul territorio), dall'obbiettivo campionario (Ferretti e Erhardt, 2002) e dal contesto territoriale di applicazione. In riferimento alle condizioni ecologiche locali dei siti idonei alla localizzazione delle stazioni di bioindicazione, è possibile considerare l'utilizzo del suolo in area di studio. L'effetto dell'impatto antropico, in termini di utilizzo del suolo, sulle comunità licheniche epifite, è oggetto recente di ricerca scientifica (e.g. Giordani et al., 2009; Pinho et al., 2008; Stofer et al., 2006) ma, nelle condizioni di frammentazione paesaggistica e di scarsità di siti adatti al campionamento riscontrabili in area di studio, si ritiene di non dover escludere tale variabile dalla pianificazione dell'indagine di bioindicazione. Nella bozza di norma in corso di approvazione in ambito CEN, le strategie di pianificazione del monitoraggio in rapporto alla realtà territoriale di applicazione costituiscono uno dei punti cardine già approvati. In tale sede, per contesti territoriali eterogenei e a bassa densità di forofiti campionabili, si prescrive l'utilizzo di un piano di campionamento stratificato randomizzato, che prevede la suddivisione del territorio in sottoaree ecologicamente omogenee, identificate in base all'utilizzo del suolo. Il contesto ambientale di indagine costituisce un caso-studio ideale di applicazione del futuro standard metodologico per la bioindicazione tramite licheni epifiti a livello Europeo.

La selezione delle stazioni di bioindicazione è stata perciò effettuata secondo una strategia di campionamento stratificato randomizzato. La sequenza delle procedure di localizzazione delle stazioni è stata applicata per fornire siti potenzialmente idonei alla localizzazione delle stazioni, ed i dettagli metodologici e la lista dei siti vengono forniti di seguito.

- I. Definizione del dominio di studio, mediante esclusione dal territorio di interesse delle classi di uso del suolo non idonee al campionamento per assenza di alberi (e.g. corpi idrici, aree prive di vegetazione o a vegetazione erbaceo/arbustiva, ecc). A partire dalla legenda Corine livello 5 della Banca Dati della Copertura del Suolo del Veneto, e dalla Carta di uso del suolo dell'Emilia-Romagna, già descritte in sede di caratterizzazione del territorio (cfr. sezione 1), sono state escluse le categorie di uso del suolo riportate in Tabella 5. Il territorio considerato per il piano di biomonitoraggio include un'area di 600 km², dei quali le terre emerse e i corpi idrici non marini occupano circa 463 km². Il dominio di studio, che include quindi solo le aree ove è potenzialmente presente vegetazione arborea adatta al biomonitoraggio, occupa 275 km² (Figura 7).

II. Definizione degli strati di campionamento, ciascuno mediante selezione di una o più tipologie di uso suolo accorpate. La definizione del numero degli strati di campionamento ha tenuto conto dell'omogeneità ecologica tra diverse categorie di uso del suolo, della superficie coperta da ciascuna categoria e della rappresentatività statistica di ciascuno strato. Si ritiene infatti necessario contenere il numero degli strati, per poter valutare non solo differenze tra strati, ma anche la variabilità del dato in ciascuno strato. Il dominio di studio è stato suddiviso in 4 strati di campionamento (Figura 8, Tabella 6). Considerando le diverse fonti di emissione di inquinanti atmosferici a livello locale, dipendenti dall'uso del suolo, sono state separate le aree agricole da quelle residenziali più o meno densamente urbanizzate, e dalla rete stradale principale. Riguardo alla rete viaria sono state incluse nello strato le due fasce adiacenti ai lati della sede stradale ove l'effetto degli scarichi veicolari non può essere trascurato. Il quarto strato è stato identificato dalle aree a vegetazione arborea includendo sia i popolamenti naturali sia le arboricoltura non da frutto.

Tabella 5 - Lista delle categorie di uso del suolo escluse dal dominio di studio

Codice	Legenda	Area (ha)	Motivo esclusione dal dominio
1214	Infrastrutture di supporto alle acque, barriere, dighe	2	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
132	Discariche	11	Accesso ristretto e possibile disturbo
213	Risaie	1394	Assenza di alberi
221	Vigneti	12	Possibili trattamenti con agenti chimici
222	Frutteti	17	Possibili trattamenti con agenti chimici
224	Altre colture permanenti	142	Possibili trattamenti con agenti chimici
331	Spiagge, dune, sabbie	387	Assenza di alberi
3312	Vegetazione delle dune litoranee	51	Assenza di alberi
411	Ambienti umidi fluviali	261	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4111	Zone umide fluviali a canneti/giuncheti	87	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4121	Zone umide lacuali a canneti/giuncheti	2	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4211	Casse di colmata aperte rispetto alla laguna o al mare	270	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4213	Barene	843	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4214	Zone umide costiere a canneti/giuncheti	27	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4215	Valli da pesca	5677	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
4231	Velme lagunari	31	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
5111	Fiumi, torrenti e fossi	2051	Corpi idrici
5112	Canali e idrovie	380	Corpi idrici
5113	Argini	89	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
5114	Alvei di fiumi e torrenti con vegetazione abbondante	13	Accessibilità ridotta e assenza di alberi
5121	Bacini senza manifeste utilizzazione produttive	15	Corpi idrici
5124	Bacini con prevalente altra destinazione produttiva	61	Corpi idrici
5211	Canali lagunari	995	Corpi idrici
5212	Specchi lagunari navigabili in condizioni di alta marea	4706	Corpi idrici
5213	Acquacolture di acqua salmastra	319	Corpi idrici
523	Mari e Oceani	900	Corpi idrici
Totale aree escluse dal dominio		18764	



Figura 7 - Carta dell'uso del suolo del dominio di studio. Per la legenda v. Figura 2. Le aree escluse dal dominio (Tabella 5) sono riportate in grigio.



Figura 8 - Suddivisione del dominio di studio in 4 strati di campionamento: aree industriali e residenziali (magenta), rete stradale e infrastrutture con territori associati (nero), aree delle unità ad uso agricolo (giallo), vegetazione naturale e colture arboree non da frutto (verde).

Tabella 6 - Suddivisione del dominio di studio in 4 strati di campionamento. Per ciascuno si riporta l'area occupata, in ha e in percentuale sul totale del dominio,

Strato	Area (ha)	Area %	classi accorpate
Aree industriali e residenziali	1192	4.2	1120 Tessuto urbano discontinuo 1121 Tessuto urbano discontinuo denso con uso misto 1122 Tessuto urbano discontinuo medio, residenziale 1123 Tessuto urbano discontinuo rado, residenziale 1130 Classi di tessuto urbano speciali 1131 Complessi residenziali comprensivi di area verde 1132 Strutture residenziali isolate 1210 Aree industriali, commerciali e dei servizi 1211 Aree destinate ad attività industriali 1213 Aree destinate a servizi pubblici, militari e privati 1330 Aree in costruzione 1340 Aree in attesa di una destinazione d'uso 1410 Aree verdi urbane 1420 Aree destinate ad attività sportive ricreative
Rete stradale e infrastrutture con territori associati	1313	4.6	1222 Rete stradale secondaria con territori associati 1230 Aree portuali
Aree delle unità ad uso agricolo	23153	81.8	2110 Terreni arabili in aree non irrigue 2111 Foraggiere in aree non irrigue 2118 Superfici a riposo in aree non irrigue 2120 Terreni arabili in aree irrigue 2121 colture annuali in aree irrigue 2122 Cereali in aree irrigue 2123 Vivali in aree irrigue 2124 Orticole in pieno campo o in serra in aree irrigue 2127 Sementi in aree irrigue 2128 Superfici a riposo in aree irrigue 2420 Sistemi culturali e particellari complessi
Vegetazione naturale e colture arboree non da frutto	2649	9.4	2241 Arboricoltura da legno 2242 Pioppeti in coltura 2310 Superfici a copertura erbacea: graminacee 2320 Superfici a prato permanente e/o spontaneo 3110 Bosco di latifoglie 3115 Impianto di latifoglie 3221 Arbusteto 3240 Vegetazione in evoluzione 3116 Saliceti e altre formazioni riparie 4122 Vegetazione arboreo/arbustiva igrofila
Totale complessivo	27506	100	

III. Calcolo del numero totale di unità di campionamento, basato sulla variabilità del dato di diversità lichenica nel territorio di interesse, stimata a partire dai dati pregressi disponibili. In relazione alla bioindicazione tramite licheni epifiti, l'obiettivo campionario è quello di fornire stime dei parametri di interesse (e.g. indici di biodiversità, frequenza delle singole specie) associate ad un livello di precisione esplicitamente definito. Tali valori possono essere stimati sulla base di studi pregressi nel territorio di interesse o, in assenza di questi, di studi pilota appositamente realizzati nelle fasi preliminari della gestione del monitoraggio. Il livello di



precisione delle stime dipende dalla variabilità dei parametri di interesse ϵ , in funzione di questa, dal numero di unità di campionamento (UC). Le formule per il calcolo della numerosità campionaria (numero di UC) sono diverse a seconda della strategia di campionamento utilizzata, e richiedono, oltre a valori arbitrariamente fissati in merito alla precisione delle stime, la conoscenza della variabilità del dato, espressa come deviazione standard dei parametri di interesse nel dominio di studio. Nel caso in oggetto, il livello di probabilità associato alla precisione delle stime è stata fissata al 95%. Data la strategia di campionamento stratificato-randomizzata, per calcolare il numero di UC sarebbe necessario conoscere la variabilità della diversità lichenica entro ciascuno strato di campionamento. In assenza di questi dati, è stata utilizzata la deviazione standard dell'Indice di Biodiversità Lichenica (I.B.L.), misurata in tutte le stazioni di rilevamento nello studio del 2003, quale stima della variabilità del dato in ciascuno strato. Nel caso in cui la deviazione standard nei diversi strati sia identica, è possibile utilizzare la formula di calcolo del numero di stazioni prevista per un campionamento randomizzato semplice, che, seguendo Elzinga et al. (2001), è la seguente:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \sigma^2}{\epsilon^2}$$

dove: n è il numero di unità di campionamento;

σ è la deviazione standard del parametro di interesse nel dominio di studio (per lo studio del 2003, $\sigma = 19.1$;

α è livello di confidenza nella stima di σ . Nel caso in oggetto viene fissato al 95% ($\alpha = 0.05$);

Z_{α} è il valore, corrispondente ad α , per la distribuzione normale standard. Nel caso in oggetto, ipotizzando che l'Indice di Biodiversità Lichenica nello studio del 2003 segua una distribuzione di frequenza normale, $Z_{0.05} = 1.96$;

ϵ è la precisione della stima fornita, ovvero l'errore atteso nella stima della media del parametro di interesse.

A partire dallo studio di bioindicazione del 2003, conoscendo il numero di UC ($n = 37$) e la deviazione standard dell'I.B.L. ($\sigma = 19.1$), fissato $Z_{0.05} = 1.96$ è possibile calcolare ϵ . Considerando invece il piano di biomonitoraggio in oggetto, ipotizzando un errore associato alla media pari a $\epsilon = \pm 5$, si ottiene, dopo le opportune sostituzioni nella formula, un numero di UC $n = 57$. Tale numerosità campionaria dovrebbe pertanto garantire l'ottenimento di stime dell'I.B.L. entro un range di ± 5 con una probabilità del 95%. Questo in condizioni di distribuzione di frequenza normale e deviazione standard invariata rispetto al 2003. Entrambe queste ipotesi sono poco probabili, e la loro validità dovrà essere verificata nel corso della prima campagna di bioindicazione durante la fase di gestione del piano di biomonitoraggio, mediante opportune analisi statistiche dei risultati. Gli esiti dovranno essere utilizzati per apportare le modifiche eventualmente necessarie al piano di campionamento, riguardanti sia il numero totale di stazioni che il numero totale di stazioni per strato.

- IV. Ripartizione del numero di stazioni in ciascuno strato in proporzione alla superficie occupata. Tale operazione è stata effettuata in ambiente GIS. Data la copertura di gran lunga predominante dello strato 3 (Aree delle unità ad uso agricolo) rispetto agli altri (Tabella 6), è stato introdotto un limite alla proporzionalità tra superficie occupata e numero di UC installate: considerando un valore soglia pari al 50% della superficie totale del dominio di studio, è stato attribuito il 50% delle UC allo strato con copertura superiore al valore soglia, ripartendo il restante 50% delle stazioni in maniera proporzionale esatta tra i rimanenti 3 strati (Tabella 7). La proporzionalità non esatta in tutti gli strati tra superficie coperta e numero di UC è stata decisa sulla base del miglior compromesso tra oggettività dello schema campionario e obiettivi specifici dello studio di bioindicazione. Infatti, la proporzionalità perfetta avrebbe comportato, a parità del numero totale di UC, una numerosità campionaria eccessivamente ridotta negli strati 1 e 2, tale da impedire la valutazione della variabilità dell'I.B.L. a livello intra-strato. Si ritiene che tale informazione debba essere acquisita per una valutazione esaustiva della variabilità della diversità lichenica epifita nel territorio di interesse. Infatti l'analisi della variabilità dei dati



a diverse scale spaziali potrebbe fornire, in sede di valutazione dei risultati durante la fase di gestione, indicazioni utili a fini interpretativi (e.g. differenze di I.B.L. tra strati diversi significativamente maggiori rispetto a quelle intra-strato, potrebbero consentire di escludere fenomeni di alterazioni riconducibili alla sorgente putativa, ma andrebbero invece ricondotte all'effetto dell'uso del suolo).

V. Selezione randomizzata delle Unità di Campionamento. Dal punto di vista statistico la popolazione di riferimento per lo studio di bioindicazione tramite licheni epifiti è costituita da Unità di Campionamento identificate da aree circolari di 30 m di raggio omogenee rispetto allo strato di appartenenza (superficie dell'UC interamente occupata dallo strato di riferimento). Il campione di UC è stato selezionato mediante estrazione casuale di coppie di coordinate geografiche, che definiscono il centro di ciascuna UC. Una volta estratto il centro, il perimetro dell'UC è stato sovrapposto in ambiente GIS alle ortofoto (Figura 10), ed è stata verificata la presenza di alberi all'interno dell'UC. Sono state escluse dal campione tutte le UC prive di alberi. Dal punto di vista biologico la popolazione di riferimento è costituita dalle comunità licheniche epifite localizzate tra 1 e 1.5 m dal suolo sui tronchi di alberi standard (v. ANPA, 2001) in un'area di 30 m di raggio situata in uno strato omogeneo per uso del suolo, così come definito al p.to II. In ogni UC l'effettuazione dei rilievi di biodiversità lichenica andrà effettuata, seguendo il protocollo ISPRA (ANPA, 2001) su tutti gli alberi idonei presenti al suo interno (cfr. "Criteri di campionabilità dei forofiti") il cui fusto sia completamente incluso entro il perimetro dell'UC. In caso di assenza di alberi idonei entro l'UC, potranno essere effettuati rilievi di biodiversità lichenica sugli alberi idonei più prossimi al centro dell'UC, localizzati entro il perimetro della parcella di pertinenza dell'UC, appartenente alla medesima classe di utilizzo del suolo. In caso di assenza di alberi idonei entro la parcella, l'UC sarà considerata non campionabile, e andrà sostituita come descritto al p.to VI.

VI. È stata effettuata l'estrazione e la verifica della presenza di alberi in un numero di UC potenzialmente campionabili in eccesso rispetto al numero di quelle previste (Tabella 7). La lista delle UC verificate (Tabelle 8, 9, 10, 11) viene fornita corredata di supporto cartografico di sintesi (Figura 9). Durante la fase gestionale del piano di monitoraggio biologico, in ciascuno strato dovrà essere verificata l'effettiva campionabilità delle UC, intesa come presenza di alberi standard, come definiti dal protocollo ISPRA (cfr. "Criteri di campionabilità dei forofiti"). In caso di verifica positiva, si procederà all'effettuazione dei rilievi di biodiversità lichenica nelle UC secondo l'ordine riportato nelle tabelle, che riflette l'ordine di estrazione casuale delle UC, fino al raggiungimento del numero di UC rilevate necessario per ogni strato (Tabella 7). L'eventuale sostituzione di un UC non campionabile dovrà essere effettuata considerando, tra quelle fornite, l'UC più vicina a quella da sostituire.

Qualora, durante la fase gestionale, fosse necessario selezionare ulteriori UC (e.g. per eliminazione dovuta a taglio di alberi), la loro localizzazione dovrà avvenire in conformità alle procedure sopra descritte (p.ti I - VI) basate sulla cartografia dell'uso del suolo descritta in sede di caratterizzazione (v. sezione 1).

Tabella 7 - Ripartizione del numero di unità di campionamento (n UC) nei 4 strati.

Strato	Descrizione	Area (%)	n UC	Densità di campionamento (km ² per stazione)
1	Aree industriali e residenziali	4.2	7	2.0
2	Rete stradale e infrastrutture con territori associati	4.6	7	2.0
3	Aree delle unità ad uso agricolo	81.8	28	8.8
4	Vegetazione naturale e colture arboree non da frutto	9.4	15	2.0
Totale complessivo		100	57	5.4



Tabella 8 - Lista delle UC selezionate per il campionamento. Per ciascuna si riporta lo strato di pertinenza, le coordinate nel sistema di proiezione European Datum 1950 Fuso 33 Nord, e distanza e direzione dalla sorgente putativa.

UC	Strato di Campionamento	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
		UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
1	FAB	283839	4982514	19.2	274
2	FAB	286449	4989948	18.7	298
3	FAB	299475	4974220	7.9	207
4	FAB	287374	4970334	19.1	235
5	FAB	290158	4981341	12.8	270
6	FAB	295672	4981518	7.3	272
7	FAB	296648	4986574	8.3	310
1	STR	283567	4981621	19.4	271
2	STR	296766	4984271	6.9	296
3	STR	296988	4977380	7.2	237
4	STR	287228	4969760	19.5	234
5	STR	284823	4989259	19.8	294
6	STR	295788	4981343	7.2	270
7	STR	289678	4980525	13.3	267
1	AGR	301142	4982578	2.3	305
2	AGR	289533	4979979	13.5	264
3	AGR	298054	4979767	5.2	253
4	AGR	283280	4987879	20.8	288
5	AGR	283913	4977539	19.5	259
6	AGR	290697	4975052	13.8	243
7	AGR	284797	4991717	21.0	300
8	AGR	284332	4983640	18.8	277
9	AGR	294655	4980603	8.4	265
10	AGR	294688	4974001	11.1	229
11	AGR	295539	4985524	8.6	300
12	AGR	293530	4969314	15.3	218
13	AGR	293324	4972407	13.1	227
14	AGR	299250	4971986	10.0	202
15	AGR	286396	4985230	17.1	283
16	AGR	292906	4983733	10.4	284
17	AGR	288662	4982256	14.4	274
18	AGR	286244	4987047	17.7	289
19	AGR	291230	4970808	15.8	228
20	AGR	299739	4978715	4.2	232
21	AGR	285132	4970149	21.1	238
22	AGR	297176	4984593	6.7	300
23	AGR	283808	4973928	20.6	249
24	AGR	284284	4981201	18.7	270
25	AGR	287797	4974337	16.7	245
26	AGR	296481	4977954	7.3	243
27	AGR	300302	4974729	7.1	202
28	AGR	288771	4990217	16.8	302
1	NAT	300221	4970322	11.3	194
2	NAT	292988	4985042	10.7	291
3	NAT	293321	4971733	13.6	225
4	NAT	288819	4970693	17.7	233



Lista delle UC selezionate per il campionamento - continua da pag. prec.

UC	Strato di Campionamento	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
		UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
5	NAT	287599	4988383	17.0	295
6	NAT	284578	4977107	18.9	257
7	NAT	290078	4983103	13.0	278
8	NAT	285070	4982588	18.0	274
9	NAT	287895	4991720	18.4	305
10	NAT	301137	4980342	2.1	243
11	NAT	287174	4980187	15.9	266
12	NAT	283834	4971262	21.6	242
13	NAT	283053	4991981	22.6	298
14	NAT	297286	4981530	5.7	272
15	NAT	284399	4974819	19.7	251

Tabella 10 - Lista delle UC di sostituzione per lo strato "Aree industriali e residenziali".

UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
FAB08	288678	4979871	14.4	264
FAB09	283556	4990524	21.5	295
FAB10	301328	4980728	1.8	251
FAB11	287963	4981037	15.0	269
FAB12	297948	4979341	5.4	249
FAB13	289070	4980622	13.9	267
FAB14	293232	4971739	13.7	226
FAB15	291845	4988865	13.5	304
FAB16	292876	4968539	16.3	218
FAB17	289704	4982017	13.3	273
FAB18	289967	4978491	13.3	258
FAB19	299464	4974486	7.7	207
FAB20	288736	4974173	15.9	243
FAB21	283259	4991128	22.1	296
FAB22	284420	4976174	19.3	255
FAB23	285867	4970049	20.5	237
FAB24	286352	4970089	20.1	236
FAB25	296854	4986506	8.1	310
FAB26	286482	4988806	18.1	294
FAB27	287299	4988444	17.3	294
FAB28	286714	4988726	17.9	295
FAB29	293545	4978331	9.9	253
FAB30	284731	4988617	19.7	292



Tabella 11 - Lista delle UC di sostituzione per lo strato "Rete stradale e infrastrutture con territori associati".

UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
STR08	288777	4978105	14.6	257
STR09	290601	4981350	12.4	270
STR10	289436	4982871	13.7	277
STR11	289436	4981010	13.6	269
STR12	289669	4973115	15.6	238
STR13	287667	4982275	15.4	274
STR14	284333	4984276	18.9	279
STR15	283615	4985668	19.9	283
STR16	285983	4979789	17.1	265
STR17	294638	4973297	11.6	226
STR18	285615	4970319	20.6	238
STR19	292506	4976911	11.4	247
STR20	290036	4972847	15.5	237
STR21	294383	4975772	10.2	237
STR22	295316	4982229	7.7	277
STR23	294008	4983447	9.2	283
STR24	295801	4980852	7.2	267

Tabella 12 - Lista delle UC di sostituzione per lo strato "Aree delle unità ad uso agricolo".

UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
AGR29	290612	4969761	16.9	227
AGR30	300522	4974288	7.4	199
AGR31	292454	4984700	11.1	288
AGR32	293240	4971210	14.0	224
AGR33	298469	4979078	5.0	244
AGR34	293880	4980517	9.2	265
AGR35	286647	4977329	16.8	256
AGR36	293406	4978106	10.1	252
AGR37	292933	4972787	13.2	230
AGR38	291663	4970812	15.4	227
AGR39	293298	4968737	15.9	218
AGR40	285375	4986495	18.4	286
AGR41	293244	4985305	10.5	292
AGR42	293888	4984630	9.7	290
AGR43	286249	4975457	17.7	251
AGR44	293189	4981525	9.8	271
AGR45	295780	4978267	7.8	247
AGR46	287214	4988509	17.4	295
AGR47	294303	4973349	11.8	228
AGR48	292447	4980269	10.6	264
AGR49	293799	4968614	15.7	216
AGR50	286569	4972734	18.5	242
AGR51	287306	4973763	17.4	244
AGR52	283325	4991862	22.3	298
AGR53	296065	4985524	8.1	301



Lista delle UC di sostituzione per lo strato "Aree delle unità ad uso agricolo" - continua da pag. prec.

UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
AGR54	287115	4971504	18.7	238
AGR55	285326	4971563	20.2	241
AGR56	284101	4975622	19.7	253
AGR57	286793	4976799	16.8	255
AGR58	287152	4974735	17.2	248
AGR59	284324	4970734	21.5	241
AGR60	285890	4971644	19.6	241
AGR61	288015	4975641	16.0	249
AGR62	284806	4976612	18.8	256

Tabella 13 - Lista delle UC di sostituzione per lo strato "Vegetazione naturale e colture arboree non da frutto".

UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
NAT16	301914	4981931	1.3	301
NAT17	301687	4979219	2.5	212
NAT18	301156	4979573	2.5	227
NAT19	288802	4981971	14.2	273
NAT20	285687	4973297	19.1	245
NAT21	286847	4980539	16.2	267
NAT22	284399	4974943	19.7	251
NAT23	284129	4973889	20.3	249
NAT24	285024	4978943	18.1	263
NAT25	283789	4973096	20.9	247
NAT26	283100	4972194	21.9	245
NAT27	284939	4979481	18.2	264
NAT28	283097	4968783	23.5	238
NAT29	284565	4975299	19.4	252
NAT30	287821	4984695	15.6	283
NAT31	297991	4980111	5.1	257
NAT32	288827	4978903	14.4	260
NAT33	291064	4989195	14.3	304
NAT34	291075	4989421	14.4	304

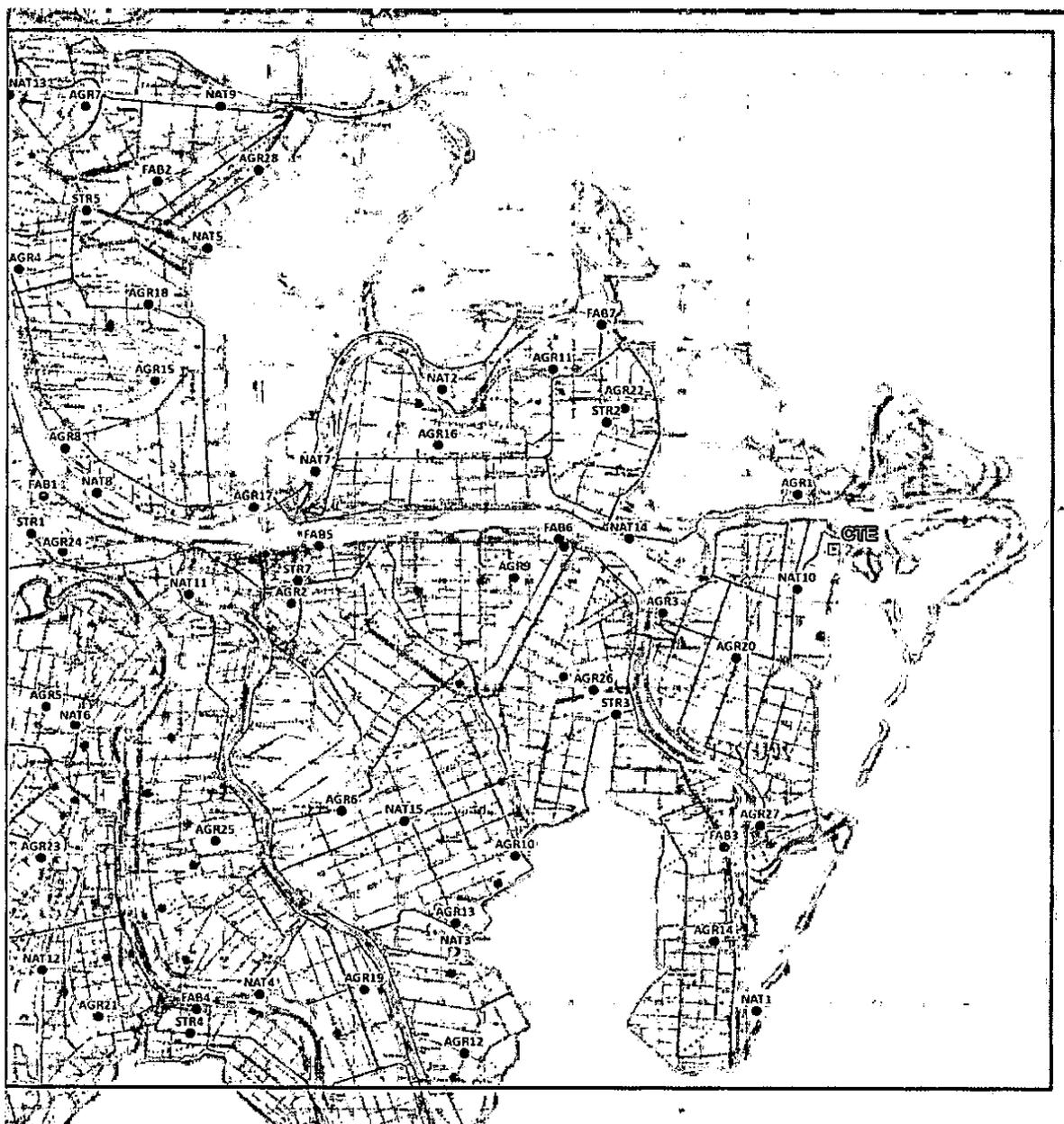


Figura 9 - Carta delle UC per i 4 strati di campionamento: aree industriali e residenziali (magenta), rete stradale e infrastrutture con territori associati (marrone), aree delle unità ad uso agricolo (giallo), vegetazione naturale e colture arboree non da frutto (verde) (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009).

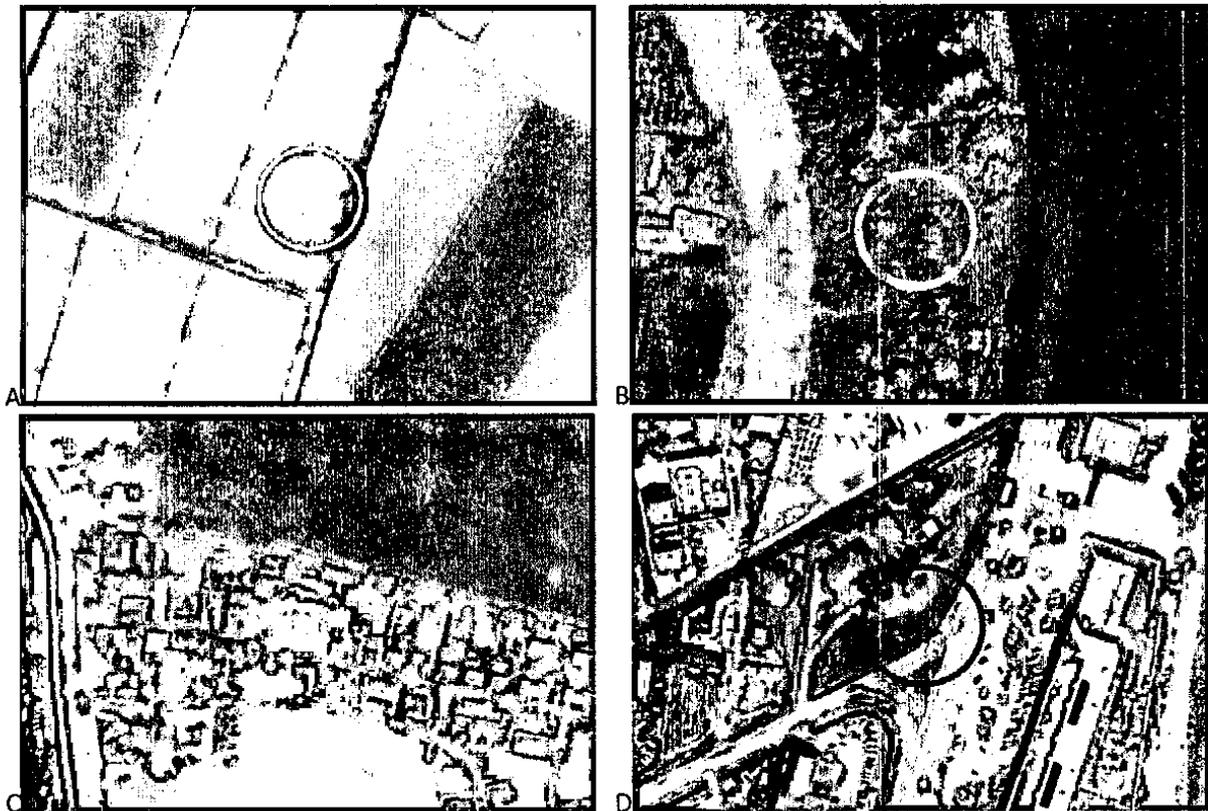


Figura 10 - Esempi di verifica positiva della presenza di alberi entro il perimetro delle Unità di Campionamento, uno per ciascuno strato di campionamento (A: aree delle unità ad uso agricolo, in giallo; B: vegetazione naturale e colture arboree non da frutto, in verde; C: aree industriali e residenziali, in magenta; D: rete stradale e infrastrutture con territori associati, in nero)

Ai fini dell'effettuazione dei rilievi di biodiversità lichenica, si riassumono di seguito le linee guida del "Manuale Operativo di I.B.L." (ANPA, 2001).

Criteri di campionabilità dei forofiti

All'interno delle UC, verranno selezionati tutti gli alberi che presentino i requisiti standard più sotto riportati.

Preferibilmente, va utilizzata una sola specie d'albero. Da un'analisi dei dati pregressi e da sopralluogo tecnico effettuato in data 13/10/2003 è emersa la difficoltà di localizzare il numero di UC previsto utilizzando una sola specie di albero. Tra le specie idonee ai rilievi, le più frequenti nel dominio di studio sono *Tilia* sp.pl., *Acer* sp.pl., *Populus nigra*, *Juglans regia* e *Quercus* sp.pl. Il protocollo ISPRA prevede l'utilizzo di alberi appartenenti a specie diverse, come nel caso in oggetto, purché appartenenti al medesimo gruppo, individuato in base alle caratteristiche fisico-chimiche della corteccia (pH, ritenzione idrica, durezza, esfoliabilità, ecc.). Si prescrive quindi, in conformità al protocollo, l'esclusione di alberi appartenenti a specie con scorza subacida, privilegiando le specie a scorza subneutra eventualmente presenti tra quelle sopra citate.

Gli alberi devono avere le seguenti caratteristiche standard, al fine di non influire sullo sviluppo naturale delle comunità licheniche, e quindi sulla qualità del dato di IBL rilevato:

- inclinazione del tronco non superiore ai 10°, per evitare effetti dovuti all'eccessiva eutrofizzazione di superfici molto inclinate;
- circonferenza minima di 60 cm, per evitare il campionamento di comunità licheniche pioniere;



- assenza di fenomeni evidenti di disturbo (verniciature, gravi malattie della pianta, ecc.);
- copertura di altri epifiti (e.g. briofite) inferiore al 25% nella fascia compresa tra 1 e 1.5 m dal suolo.

Per ciascuno degli alberi standard, dovrà essere compilata e fornita al Committente una scheda monografica riportante le seguenti informazioni:

CODICE STAZIONE: codice alfanumerico, comprendente l'identificativo dell'UC e dello strato di campionamento di pertinenza del forofita.

CODICE FOROFITA: è un contatore progressivo che identifica in modo univoco il forofita all'interno dell'UC di pertinenza.

Fissati i due codici sopra descritti, si identifica in maniera univoca ogni forofita rilevato.

DATI STAZIONALI: comprendono la data e l'ora del rilevamento, e i dati amministrativi (Regione, Provincia, Comune, Località e Indirizzo).

DATI FOROFITA: comprendono dati biologici, morfologici, geografici e di posizionamento. Vanno registrati i dati seguenti:

SPECIE: per la collocazione tassonomica del forofita.

CIRCONFERENZA DEL FUSTO: va riportata la misura in cm, presa all'altezza di 1,3 m circa dal suolo, con apposito metro flessibile.

COPERTURA BRIOFITE: in valori percentuali uno per ogni porzione della corteccia su cui va applicato il reticolo di campionamento (N, E, S, O).

COORDINATE UTM DEL FOROFITA: va riportata la posizione del forofita nel sistema di coordinate ED50 UTM fuso 33 Nord. La posizione va registrata mediante ricevitore satellitare GPS, come media di almeno 20 posizioni. I dati di georeferenziazione vanno verificati mediante correzione differenziale, mediante sistema DGPS (Differential Global Positioning System), utilizzando i dati delle stazioni fisse localizzate in prossimità del dominio di studio.

LOCALIZZAZIONE DEL FOROFITA NELLA STAZIONE: riporta una descrizione testuale dettagliata del sito di campionamento, allo scopo di facilitare l'identificazione del forofita per il rilievo di IBL, con attenzione particolare ad eventuali punti di riferimento.

FOTOGRAFIA DEL FOROFITA: riporta un'immagine fotografica del forofita (o un'immagine del gruppo di forofiti cui esso appartiene, indicandolo in modo univoco), acquisita mediante macchina fotografica digitale, allo scopo di integrare la descrizione testuale sulla localizzazione dell'albero.

CARTA TOPOGRAFICA DELLA STAZIONE: va riportata un'area di almeno 250 x 250 m, derivante dalla cartografia di base a grande scala (e.g. CTR, ortofoto) centrata sulla posizione del forofita, che va indicato con un simbolo apposito. Va inoltre riportato sulla carta un simbolo indicante la posizione e la direzione verso cui è stata scattata l'immagine fotografica, nel caso di gruppi di forofiti.

NOTE: riportano eventuali informazioni aggiuntive.

Rilievi di Biodiversità Lichenica

Su ciascun albero va rilevata la frequenza delle diverse specie di licheni epifiti in un reticolo di forma e dimensioni standardizzate, sovrapposto al tronco secondo modalità standard.

Il reticolo di campionamento è costituito da quattro subunità, ciascuna formata da una serie lineare di cinque quadrati di 10 x 10 cm, che devono essere disposte verticalmente sul tronco in corrispondenza dei quattro punti cardinali (Figura 11). La parte inferiore di ciascuna unità va posizionata ad un'altezza di 1 m dal suolo.

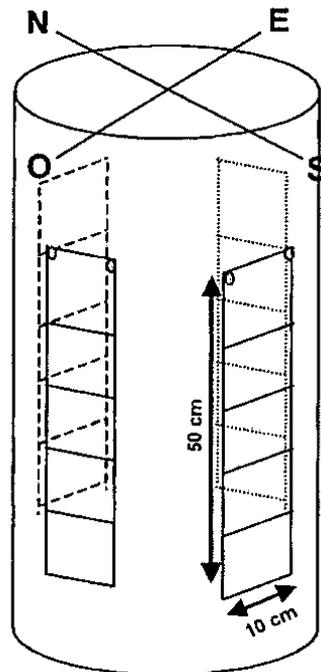


Figura 11 - Reticolo di campionamento per la stima della biodiversità lichenica e posizionamento sul fusto di ogni forofita (v. testo).

Una volta disposto il reticolo sul tronco, su una apposita "Scheda di Raccolta Dati" vanno annotate tutte le specie licheniche (inclusi i licheni crostosi sterili) presenti all'interno di ciascuna unità e la loro frequenza, calcolata come numero di quadrati in cui ogni specie è presente (i valori di frequenza di ciascuna specie variano quindi tra 0 e 5). Se lo stesso tallo è presente in più di un quadrato, la frequenza della specie è pari al numero di quadrati in cui esso è presente.

Vanno evitati l'asporto e il danneggiamento dei licheni entro l'area del reticolo, per permettere un'eventuale ripetizione dello studio. Se l'esatta identificazione di una specie richiede analisi in laboratorio, si asporta un piccolo campione, quando presente, al di fuori del reticolo.

Il valore dell'Indice di Biodiversità Lichenica relativo all'albero campionato (IBL_a) si ottiene facendo la somma delle frequenze rilevate per ciascuna subunità.

Calcolo del Valore di Biodiversità Lichenica

Il valore di Biodiversità Lichenica della stazione di campionamento è stimato statisticamente sulla base dei valori rilevati nell'UC.

Il primo passo è sommare le frequenze delle specie rilevate su ciascun albero. Poiché è prevedibile una sostanziale differenza di crescita sui diversi lati del tronco, le frequenze vanno tenute separate per ciascun punto cardinale. Per ciascun j -esimo albero si otterranno così quattro rilievi (N, E, W, S) e quattro somme di frequenze (BL_jN , BL_jE , BL_jW , BL_jS), una per ogni rilievo. In ciascuna stazione si effettuano le seguenti operazioni:

Il valore dell'Indice di Biodiversità Lichenica della stazione di campionamento è stimato statisticamente sulla base dei valori rilevati nella stazione stessa.

Per ciascuna stazione sono state effettuate le seguenti operazioni di calcolo:

- somma, per ciascun rilievo, delle frequenze di tutte le specie (IBL del rilievo):



$$BL_j X = \sum_{i=1}^n f_i$$

dove $BL_j X$ è il risultato del rilievo di biodiversità lichenica (BL) eseguito sul j -esimo albero in corrispondenza del punto cardinale X ; f_i è la frequenza nel reticolo di campionamento della i -esima specie lichenica; n è il numero di specie licheniche rilevate.

- media delle BL di tutti i rilievi presi nello stesso punto cardinale:

$$BLX_s = \frac{\sum_{j=1}^k BL_j X_s}{k}$$

dove BLX_s è il valore di BL del punto cardinale X nella stazione s ; $BL_j X_s$ è il valore di BL ottenuto per il punto cardinale X ed il j -esimo albero della stazione s , così come calcolato al punto precedente; k è il numero di alberi della stazione s in cui è stato effettuato il rilievo in corrispondenza del punto cardinale X .

- somma delle BL dei 4 punti cardinali (BL della stazione).

$$BL_s = BLN_s + BLE_s + BLS_s + BLO_s$$

dove BLN_s , BLE_s , BLS_s e BLO_s sono i valori di BL dei punti cardinali nord, est, sud ed ovest nella stazione s , così come calcolati al punto precedente.

ELABORAZIONE DEI DATI

Matrici di input

È prevista la compilazione di alcune matrici per l'analisi dei dati:

Esposizioni \times LDV_{exp}

Contiene i valori della somma delle frequenze di ciascuna specie lichenica rilevata all'interno di ogni singolo reticolo di campionamento 10×50 cm, posizionato sulle 4 esposizioni cardinali di ciascun albero rilevato. Come da esempio:

UC	ALBERO	ESPOSIZIONE	LDVEXP
FAB1	1	N	15
FAB1	1	E	3
FAB1	1	S	7
FAB1	1	W	12
FAB1	2	N	45
FAB1	2	E	34
FAB1	2	S	21
FAB1	2	W	23
FAB2	1	N	0
FAB2	1	E	0
FAB2	1	S	25
FAB2	1	W	7

**Alberi × LDV_{alb}**

Contiene i valori di LDV a livello di albero (somma dei valori LDV_{esp} per ciascuna albero).

UC	Albero	LDV _{ALB}
FAB1	1	37
FAB1	2	123
FAB2	1	32
FAB3	1	60
FAB3	2	21
FAB3	3	7
FAB3	4	109
FAB3	5	86
FAB4	1	45
STR08	1	65
STR08	2	38
STR08	3	3

Unità Campionarie × LDV_{uc}

Contiene i valori medi di ldv a livello di uc (media dei valori ldvalb per ciascuna uc).

UC	LDV _{uc}
FAB01	80
FAB02	32
FAB03	56,6
FAB04	45
STR08	35,3

Unità Campionarie × Specie

Contiene le frequenze medie di ciascuna specie a livello di UC.

UC	Specie 1	Specie 2	Specie 3	Specie 4	Specie 5	Specie n
FAB01	20	20	10	10	20	0
FAB02	12	20	0	0	0	0
FAB03	16,6	7	5	5	20	0
FAB04	15	10	0	0	5	0
STR08	0	20	10	5	0,3	0
AGR03	0	5	4	13	20	12

Unità Campionarie × Variabili ambientali

Contiene informazioni a livello di UC delle seguenti variabili ambientali potenzialmente predittive dei valori LDV_{uc}. In particolare:



UC	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE		Strato uso del suolo	Circonferenza media alberi (cm)	Specie arborea
	UTM Est	UTM Nord	Distanza (Km)	Direzione			
FAB01	290158	4981341	11.8	O	FAB	65,3	<i>Populus nigra</i>
FAB02	288678	4979871	13.4	O	FAB	102,0	<i>Populus nigra</i>
FAB03	286449	4989948	17.8	NO	FAB	137,0	<i>Populus nigra</i>
FAB04	301328	4980727	0.8	SO	FAB	89,0	<i>Populus nigra</i>
STR08	290392	4985333	12.3	ONO	STR	97,0	<i>Juglans regia</i>
STR09	290036	4972847	14.6	SO	STR	123,0	<i>Juglans regia</i>
STR10	296988	4977381	6.3	SO	STR	86,9	<i>Populus nigra</i>
AGR01	301142	4982778	1.8	NO	AGR	65,6	<i>Juglans regia</i>
AGR02	293888	4984629	8.8	ONO	AGR	78,2	<i>Juglans regia</i>
AGR03	298054	4979767	4.2	OSO	AGR	145,0	<i>Populus nigra</i>

Statistiche descrittive

Da applicare a tutte le matrici

Calcolare le seguenti statistiche descrittive:

- N° casi validi
- Media
- Deviazione standard
- Varianza
- Mediana
- Quartili
- Min
- Max
- Skewness
- Coefficiente di variazione %.

È richiesta la visualizzazione dei risultati in Tabella e in grafici Box-plot.

Trasformazione dei dati

Preliminarmente alle analisi esplorative sono necessarie alcune procedure di aggiustamento e di trasformazione dei dati delle matrici grezze. Nel testo seguente in sottolineato sono riportate le opzioni di calcolo da applicare alle matrici.

Trattamento di ulteriori dati mancanti

Da applicare a tutte le matrici

Utilizzare la pairwise deletion. Questa tecnica predispone l'analisi in modo da escludere i singoli dati mancanti, senza perdere l'informazione contenuta nel resto del dataset. Opzioni per l'applicazione in automatico della pairwise deletion alle analisi dei dati sono presenti nei più comuni software statistici.

	Specie1	Specie2	Specie3	Specie4	Specie5
UC1	20	7	4	0	0
UC2	20	X	5	12	0
UC3	9	19	9	13	9
UC4	8	18	15	0	20
UC5	13	20	12	0	20



Correlazioni	Specie1	Specie2	Specie3	Specie4	Specie5
Specie1	1,00	-0,85	-0,86	0,04	-0,79
Specie2	-0,85	1,00	0,80	0,33	0,83
Specie3	-0,86	0,80	1,00	-0,37	0,96
Specie4	0,04	0,33	-0,37	1,00	-0,46
Specie5	-0,79	0,83	0,96	-0,46	1,00

Esempio: nella matrice sottostante è andato perso per un errore di trascrizione il valore di frequenza nel reticolo della Specie2 nella Unità di Campionamento 2. Applicando una pairwise deletion, l'analisi (nell'esempio una correlazione lineare) non calcolerà la relazione tra Specie2 e le altre specie per la UC2, ma calcolerà comunque quella tra Specie1 e Specie3 in UC2. Inoltre, utilizzerà solo UC1, UC3, UC4 e UC5 per calcolare la relazione tra Specie1 e Specie2.

Trattamento specie rare

Da applicare alla matrice **Unità Campionarie × Specie**

Escludere le specie rare (presenti in < 5% delle UC).

L'esclusione delle specie rare dall'analisi, al costo di una relativa perdita di informazione, permette di eliminare parte del rumore di fondo e di estrarre pattern di variabilità più chiaramente associabili ai predittori ecologici esaminati (in questo caso ad es. distanza dalla centrale).

Trasformazioni di variabili

Da applicare alle matrici:

- **Unità Campionarie × Variabili ambientali**
- **Unità Campionarie × Specie**

Applicare una trasformazione monotonica logaritmica ($b_{ij} = \log(x_{ij})$) alle seguenti variabili ambientali:

- Frequenza delle specie
- Distanza dalla centrale

Una trasformazione monotonica cambia i valori dei dati di una variabile in tutti i casi osservati senza alterare la loro distribuzione per ranghi (McCune et al., 2002). In particolare, la trasformazione logaritmica riduce l'effetto sulle analisi statistiche delle differenze di ordini di grandezza tra e/o all'interno delle variabili della matrice.

Relativizzazione

Non applicare relativizzazioni alle matrici.

La relativizzazione riscalda le singole righe e/o colonne di una matrice, in base a criteri contenuti nelle altre righe e/o colonne (es. valore massimo). Viene di solito applicata in presenza di elevati valori di coefficiente di variazione % per evitare effetti di distorsione sui risultati delle analisi (Legendre & Legendre, 1998). Tuttavia, il suo utilizzo è sconsigliato quando, come nel caso di un biomonitoraggio, l'indagine delle differenze effettive tra i valori sia un obiettivo del lavoro.

Analisi degli outlier

Da applicare alle matrici:



Unità Campionarie x Specie
Unità Campionarie x Variabili ambientali

Escludere le Unità campionarie con deviazione standard media > 3,0 delle distanze (Sørensen similarity) dalle altre UC.

Vengono considerati outlier Unità Campionarie con combinazioni estreme di valori per le variabili in esame. Considerando che nel caso di un biomonitoraggio alcuni outlier possono rappresentare un'informazione importante (es. deserto lichenico o valori molto alti di diversità), per questo lavoro si imposta un valore molto alto di deviazione standard per evitare comunque l'influenza di altri tipi di anomalie del set di dati. Esempio numerico:

	Specie1	Specie2	Specie3	Specie4	Specie5	Specie6	Specie7	Specie8	Specie9	Specie10
UC1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC2	20	20	20	20	20	20	20	18	20	20
UC3	20	20	20	20	20	19	20	20	19	20
UC4	20	20	20	20	20	20	20	18	19	19
UC5	20	20	20	20	20	20	20	19	20	18
UC66	20	20	20	20	20	20	20	20	16	20
UC7	20	20	20	20	20	19	20	18	20	20
UC8	20	20	20	20	20	18	20	20	20	20
UC9	20	20	20	19	20	19	20	19	20	18
UC10	18	17	20	20	18	20	20	20	19	20
UC11	17	20	20	18	19	20	20	19	16	20
UC12	20	20	17	17	20	20	19	20	20	16

Frequenza media di 10 specie in 12 Unità Campionarie

	UC1	UC2	UC3	UC4	UC5	UC6	UC7	UC8	UC9	uc10	UC11
UC 2	.100000 E+01										
UC 3	.100000 E+01	.101010 E-01									
UC 4	.100000 E+01	.507614 E-02	.101523 E-01								
UC 5	.100000 E+01	.759494 E-02	.126582 E-01	.763359 E-02							
UC 6	.100000 E+01	.152284 E-01	.101523 E-01	.153061 E-01	.178117 E-01						
UC 7	.100000 E+01	.253165 E-02	.759494 E-02	.763359 E-02	.101523 E-01	.178117 E-01					
UC 8	.100000 E+01	.101010 E-01	.505051 E-02	.152284 E-01	.126582 E-01	.152284 E-01	.759494 E-02				
UC 9	.100000 E+01	.127226 E-01	.127226 E-01	.127877 E-01	.510204 E-02	.230179 E-01	.102041 E-01	.127226 E-01			
UC 10	.100000 E+01	.256410 E-01	.205128 E-01	.257732 E-01	.282776 E-01	.257732 E-01	.282776 E-01	.256410 E-01	.335917 E-01		
UC 11	.100000 E+01	.284238 E-01	.284238 E-01	.285714 E-01	.310881 E-01	.181818 E-01	.310881 E-01	.335917 E-01	.312500 E-01	.288714 E-01	
UC 12	.100000 E+01	.335917 E-01	.335917 E-01	.337662 E-01	.259067 E-01	.389610 E-01	.362694 E-01	.335917 E-01	.260417 E-01	.498688 E-01	.476190 E-01

*Matrice di distanza (Sorensen similarity) tra le UC*

UC	SORENSEN MEDIO	DEV. STANDARD
UC1	1.00000	3.17443
UC12	0.12356	-0.23516
UC11	0.11883	-0.25358
UC10	0.11748	-0.25885
UC6	0.10886	-0.29236
UC9	0.10729	-0.29848
UC8	0.10649	-0.30157
UC4	0.10563	-0.30493
UC7	0.10538	-0.30591
UC5	0.10535	-0.30600
UC2	0.10464	-0.30879
UC3	0.10463	-0.30881

Individuazione dell'outlier (Deviazione Standard delle distanze > 3,0)

Analisi multivariate esplorative**Analisi gerarchica dei gruppi (hierarchical clustering)**

Da applicare alla matrice Unità Campionarie x Specie. N.B. va realizzata un'analisi dei gruppi di Unità Campionarie e un'analisi dei gruppi delle Specie.

Benchè siano possibili diverse combinazioni di misure di distanza e metodo di unione, sulla base di una revisione bibliografica dei vantaggi e svantaggi dei metodi più comunemente utilizzati in lavori di biomonitoraggio, si suggerisce di utilizzare i seguenti criteri:

Misura di distanza

È suggerito l'utilizzo della Sørensen similarity (noto anche come Coefficiente di Bray-Curtis – Faith et al., 1987), data da

$$S = 2W/(A+B)$$

Dove

W = sovrapposizione tra la specie A e la specie B nella matrice di dati.

Sørensen pesa asimmetricamente il contributo della co-presenza e della co-assenza di ciascuna coppia di specie nella matrice. In particolare, ignora la co-assenza e assegna un fattore di moltiplicazione x2 alla presenza congiunta di due specie in un rilievo.

Secondo diversi autori (McCune et al., 2002), la distanza di Sørensen è da preferire nell'analisi di comunità ecologiche. Originariamente pensato per dati binari, viene ormai comunemente applicato anche per dati quantitativi. La formula diventa:

$$\text{Quantitative Sørensen similarity} = 1 - (2 \sum \text{MIN}(a_{ij}, a_{hj}) / (\sum a_{ij} + \sum a_{hj}))$$

Dove

a_{ij} = la frequenza media nel reticolo della **specie i** nella Unità Campionaria **j**

a_{hj} = la frequenza media nel reticolo della **specie h** nella Unità Campionaria **j**

$\text{MIN}(a_{ij}, a_{hj})$ = il valore minimo di frequenza delle **specie i** vs. **specie h** nella UC **j**

Linkage method



Va utilizzato il metodo del Flexible Beta (con $\beta = -0.25$).

Il metodo di linkage definisce la strategia con cui vengono aggregati gli elementi della matrice. Il Flexible Beta è un metodo combinatorio che permette una notevole flessibilità nella contrazione o espansione dell'originale spazio multidimensionale dei dati, rispetto allo spazio definito dal dendrogramma finale dei gruppi. Per valori di $\beta = -0.25$, questo metodo produce risultati molto simili al metodo di Ward, il cui uso è però incompatibile con la misura di distanza di Sørensen.

Criterio di individuazione dei gruppi

Si suggerisce di applicare la Indicator Value Analysis (IVA - Dufrene & Legendre 1997) su diversi tagli del dendrogramma per evidenziare la soluzione che ottimizzi un'elevata omogeneità all'interno dei gruppi, un sufficiente livello di varianza spiegata e un numero ottimale di gruppi. L'Indicator Value è basato sulla combinazione dell'abbondanza e della frequenza relative di ciascuna specie in ciascun gruppo considerato ed è calcolato come segue:

$$IV_{ij} = A_{ij} * B_{ij} * 100$$

Dove:

$$A_{ij} = N \text{ individui }_{ij} / N \text{ individui }_i$$

Cioè l'abbondanza relativa della specie i nel gruppo j

$$B_{ij} = N \text{ stazioni }_{ij} / N \text{ stazioni }_j$$

Cioè la frequenza relativa della specie i nel gruppo j

Esso è massimo quando tutti gli individui di una specie sono trovati in un singolo gruppo di rilievi e quando le specie sono presenti in tutti i rilievi di quel gruppo: si tratta, quindi, di un indicatore simmetrico.

Successivamente, la significatività statistica del massimo IV calcolato per ciascuna specie va valutata mediante un Montecarlo test: si tratta di una procedura randomizzata che stima la significatività del massimo IV calcolato per ciascuna specie, confrontandolo con l'IV medio ottenuto dal sorteggio random di 1000 campioni indipendenti dalla variabile in esame.

Il metodo dell'Indicator Value (IV) è utilizzato per selezionare le specie e i gruppi di specie indicatrici di una determinata situazione ambientale (habitat e diversi livelli dei fattori di disturbo). Le specie indicatrici sono definite come le più caratteristiche di ciascun gruppo, rilevate principalmente in un gruppo di una determinata tipologia ambientale e presenti nella maggior parte dei siti appartenenti a quel gruppo.

Procedura in sintesi:

- Produrre alcune soluzioni di raggruppamento (es. formando 3, 4 e 5 gruppi dallo stesso dataset di UC).
- Utilizzare il codice di gruppo come variabile categorica.
- Per ogni livello di raggruppamento, calcolare IV per ciascuna specie in ciascun gruppo.
- Calcolare l'IV medio per le specie di ciascun gruppo (e l'IV medio complessivo del taglio selezionato)
- Selezionare il taglio con il maggiore valore IV medio.



Rappresentazione grafica del dendrogramma

Numerosi software statistici danno la possibilità di visualizzare il dendrogramma di classificazione, fornendo spesso numerose opzioni grafiche. Tra le numerose opzioni, vanno obbligatoriamente riportate nel report finale

- I livelli di taglio del dendrogramma e i gruppi conseguentemente costituiti.
- La distanza effettiva ai diversi livelli di cluster.
- La varianza spiegata (e/o l'informazione rimasta) al livello di taglio selezionato nella formazione dei gruppi.

Valutazione delle differenze tra gruppi

Per confrontare la composizione delle comunità licheniche epifite nei diversi gruppi è consigliabile l'applicazione della Multi Response Permutative Procedure (MRPP). Vanno impostati i seguenti parametri:

Questa tecnica non parametrica permette di verificare l'ipotesi che la composizione specifica dei gruppi (quelli individuati nella cluster analysis in questo caso) sia significativamente diversa da quella ottenibile da una serie di iterazioni randomizzate dello stesso dataset (Mielke, 1984). MRPP restituisce una "chance-corrected within-group agreement (A)" che descrive l'omogeneità entro gruppi, confrontandola con quella ottenibile da una serie di iterazioni randomizzate.

Alcuni software calcolano in automatico i seguenti passaggi. È tuttavia fondamentale prestare attenzione ad alcune opzioni di calcolo (sottolineate di seguito). Procedura in sintesi:

- Calcolare una matrice di distanza (misura di distanza: Sørensen similarity).
- Calcolare la distanza media x_i in ciascun gruppo i .
- Calcolare la distanza media pesata "entro-gruppi": $\delta = \sum C_i x_i$ dove $C_i = n_i / \sum(n_i)$.
- Determinare la probabilità di ottenere δ minori ($p < 0,05$).
- Calcolare "chance-corrected within-group agreement: $A = 1 - (\delta_{osservata} / \delta_{attesa})$, dove δ_{attesa} è il valore di δ secondo una distribuzione continua di Pearson (tipo III).

FASE INTERPRETATIVA DEI DATI DI BIOINDICAZIONE

Verificare e discutere la corrispondenza tra i gruppi formati dalla cluster analysis e la distribuzione delle stazioni nello spazio ecologico e geografico (es.: esiste una corrispondenza tra i raggruppamenti della hierarchical clustering e le tipologie di uso del suolo? O con una esposizione cardinale rispetto alla centrale?).

Ordinamento

Da applicare alle matrici:

Unità Campionarie x specie

Unità Campionarie x variabili ambientali

È suggerito l'utilizzo del global Nonmetric Multidimensional Scaling (NMS o MDS).

Il Metodo NMS è una ricerca iterativa della miglior posizione di n entità in k dimensioni (assi) che minimizza lo stress della configurazione finale a k -dimensioni (Kruskal, 1964).

Lo stress è una misura della deviazione dalla monotonicità nella relazione tra distanza nello spazio originale p -dimensionale e distanza nello spazio ridotto k -dimensionale.



Secondo McCune et al. (2002), questa tecnica ha alcuni vantaggi rispetto ad altri metodi di ordinamento:

- Non assume relazioni lineari tra le variabili.
- Permette l'uso di qualunque tipo di misura di distanza e/o relativizzazione.

Impostazione dell'analisi

Anche in questo caso numerosi software statistici sono in grado di eseguire in automatico i complessi passaggi di calcolo richiesti da questa tecnica. Tuttavia, va posta molta attenzione ad alcuni passaggi che richiedono la scelta dell'operatore. Il setting illustrato nella lista sottostante fa riferimento al software PC-ORD (MJM software - Mc Cune & Mefford, 1999). Altri software possono presentare impostazioni leggermente diverse, in ogni caso vanno obbligatoriamente seguite le raccomandazioni sottolineate nell'elenco successivo. A seguito dell'analisi, nel report andranno riportate le seguenti informazioni:

- Misura di distanza (Sørensen similarity; cfr. paragrafo sul hierarchical clustering).
- Software utilizzato.
- Numero di dimensioni della soluzione finale (solitamente ≤ 3)
- Stress (è accettabile uno Stress < 20)
- Risultati del Monte Carlo test (stress della soluzione finale vs. stress in n iterazioni randomizzate – $p < 0,05$).
- Numero di iterazioni della soluzione finale (40 sulla matrice originale; 50 randomizzate).
- Stabilità della soluzione finale ($< 1 \cdot 10^{-4}$).
- Eventuali rotazioni dell'ordinamento rispetto ad una variabile predittiva (es. Varimax rotation).
- Proporzione di varianza rappresentata in ciascun asse dell'ordinamento (in termini di r^2 tra la distanza nello spazio dell'ordinamento e quella nel dataset originale).
- Correlazioni (Pearson r) delle variabili predittive con gli assi dell'ordinamento.
- Correlazioni (Pearson r) delle specie con gli assi dell'ordinamento.

Rappresentazione grafica dell'ordinamento

Nel report finale vanno riportati:

- Rappresentazione grafica degli assi per tutte le dimensioni selezionate (es. Asse 1 vs. Asse 2 e asse 1 vs. asse 3 nel caso di una soluzione finale 3-dimensionale): ordinamento delle specie e delle UC.
- Varianza rappresentata da ciascun asse.
- Joint plot delle variabili predittive.
- Categorizzazione delle UC plottate nell'ordinamento, rispetto ai gruppi individuati dalla precedente cluster analysis e rispetto alla stratificazione per uso del suolo.

Vanno riportate e discusse le relazioni tra assi, specie licheniche e variabili predittive ambientali. L'interpretazione dei risultati dell'ordinamento dovrà essere basata sul valore e sulla significatività delle correlazioni tra gli assi dell'ordinamento e le specie licheniche, gli assi dell'ordinamento e le UC, e gli assi dell'ordinamento e le variabili ambientali (landcover, distanza e direzione CTE, circonferenza fusto media, specie arborea, ...), calcolata, caso per caso, come livello di probabilità associata ai valori del coefficiente di correlazione forniti dall'NMS. Per gli obiettivi di questo lavoro, vanno considerate rilevanti le correlazioni (Pearson r) $> 0,300$ con $p < 0,05$.

Interpretazione dei dati LDV

**Analisi della diversità lichenica in relazione all'uso del suolo**

Questo approccio permetterà di verificare con un approccio univariato l'effetto dell'uso del suolo sulla diversità lichenica. Va applicata un'analisi ANOVA ad una via, impostando LDV_{UC} come variabile dipendente e lo strato uso-suolo come variabile predittiva categorica. L'effetto deve essere considerato significativo se $p < 0,05$. Un test post-hoc (si consiglia LSD di Fisher) va inoltre applicato per verificare la significatività ($p < 0,05$) delle differenze tra coppie di strati di uso-suolo (es. AGR vs. STR).

Ampiezza delle classi di diversità lichenica

L'interpretazione della diversità lichenica segue il metodo VDI (1995). L'ampiezza delle classi di diversità lichenica viene stabilita in seguito all'analisi della deviazione standard di tutte le UC rilevate nel corso del monitoraggio:

Deviazione standard media dell'area studio

$$s = \sqrt{\sum \sum (LDV_{albij} - LDV_{UCj})^2 / m(n-1)}$$

Ampiezza delle classi

$$A = t (s/\sqrt{n})$$

Dove

LDV_{albij} = somma delle frequenze delle specie licheniche per l'albero i nella Unità Campionaria j

LDV_{UCj} = LDV medio della UC j

s = deviazione standard media delle UC dell'area studio

n = numero medio di alberi rilevati per UC

m = numero di UC rilevate

t = è il valore critico della distribuzione di Student per $n-1$ gradi libertà ($\alpha = 0,05$)

Il valore di A va approssimato al numero intero più vicino. Le classi di diversità vengono conseguentemente individuate da multipli dei valori di A .

Esempio:

$$s = 15$$

$$n = 3$$

$$m = 30$$

$$t = 1.697$$

$$LDV_{max} = 90$$

$$A = 1,697 (15/\sqrt{3}) = 14,7 \rightarrow \text{approssimato a } 15$$

*Scala interpretativa della diversità lichenica*

LDV	Classe
0 – 15	Classe 6
16 – 30	Classe 5
31 – 45	Classe 4
46 – 60	Classe 3
61 – 75	Classe 2
76 – 90	Classe 1

In questo monitoraggio non viene applicato l'approccio interpretativo proposto da Loppi et al. (2002), basato sul discostamento percentuale dai valori massimi IBL, rilevati nelle diverse regioni bioclimatiche italiane. Questo metodo si basa sulla definizione di Nimis (1999a) secondo cui le tecniche di biomonitoraggio stimano il grado di alterazione da condizioni "normali" o "naturali" provocato dagli effetti dell'inquinamento atmosferico su componenti sensibili degli ecosistemi (in questo caso i licheni). Loppi et al. (2002) hanno stabilito quale soglia di massima diversità potenziale il valore di LDV corrispondente al 98° percentile della distribuzione dei valori potenzialmente ottenibili in macroregioni climatiche in cui può essere potenzialmente suddiviso il territorio italiano (vedi Nimis & Tretiach 1995, Nimis in Nimis & Martellos 2008). La media dei valori maggiori rispetto alla soglia di massima diversità potenziale viene considerata come massimo valore LDV potenziale, e quindi le classi di alterazione sono ottenute come discostamenti percentuali da questo valore. La soglia di massima diversità potenziale è stata stabilita nel valore di LDV corrispondente al 98° percentile della distribuzione dei valori potenzialmente ottenibili in macroregioni climatiche in cui può essere potenzialmente suddiviso il territorio italiano. La media dei valori maggiori rispetto alla soglia di massima diversità potenziale viene considerata come massimo valore LDV potenziale. Le classi di alterazione sono ottenute con discostamenti percentuali da questo valore.

Due dati di fatto sconsigliano l'applicazione di questo approccio nel presente progetto di biomonitoraggio. Primo, si registra la mancanza di situazioni ambientali di riferimento (quindi a bassa o nulla alterazione della vegetazione lichenica) in aree bioclimatiche direttamente comparabili a Porto Tolle. Geograficamente parlando, l'area di studio rientra ovviamente nella regione adriatica così come definita da Castello & Skert (2005), ma considerazioni di tipo ecologico e climatico sconsigliano di applicare acriticamente la loro scala interpretativa, per le evidenti differenze tra la regione deltizia e le regioni che hanno fatto registrare i valori più elevati di biodiversità lichenica epifita. Non a caso, infatti, Nimis (in Nimis & Martellos 2008) aveva proposto una specifica regione bioclimatica per la regione padana (compresa la porzione costiera), che è supportata da evidenze floristiche (Tretiach et al. 2007). Il secondo fatto deriva dal numero di stazioni di campionamento (n=57 identificato come ottimale in base ad una serie di fattori (vedi cap. 3.1 par. III per questa area di studio). Se anche si volesse applicare l'approccio interpretativo di Loppi et al. (2002) in sede locale, il massimo valore LDV potenziale di riferimento, vista la relativa esiguità numerica delle stazioni, non sarebbe più un valore mediato, ma corrisponderebbe a quello di una singola stazione (più banalmente, sarebbe il valore massimo riscontrato).

Visti questi oggettivi limiti, nella fase di interpretazione dei dati di bioindicazione si suggerisce di escludere questo tipo di approccio o di limitarlo a confronti qualitativi con studi progressi condotti nella stessa area di indagine.



SCHEMA TEMPORALE DI ESECUZIONE

A fini del piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, le indagini di biomonitoraggio con licheni epifiti come bioindicatori andranno effettuate a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione per un totale di quattro campagne di rilievi da effettuare nell'arco di dieci anni (una campagna di rilievi ogni tre anni). La prima campagna dovrà essere considerata un vero e proprio studio pilota, teso all'ottimizzazione della rete di monitoraggio per le campagne successive.



3.2. BIOACCUMULO TRAMITE LICHENI EPIFITI AUTOCTONI

Questa tecnica fornisce misure di concentrazione di elementi in traccia in campioni di talli lichenici autoctoni, spontaneamente presenti nel territorio di interesse. I risultati, riferiti ai siti di prelievo dei campioni, consentono la stima del pattern di deposizione degli elementi monitorati, riferiti a periodi di tempo relativamente lunghi, corrispondenti alla crescita delle porzioni talline prelevate.

L'apporto al tallo lichenico di elementi in traccia, presenti come contaminanti nell'atmosfera, avviene per deposizione secca ed umida. Evidenze sperimentali supportano tre differenti modalità di immobilizzazione nel tallo: l'intrappolamento di particolato, la complessazione ionica extracellulare e la complessazione ionica intracellulare.

L'intrappolamento di particolato riguarda l'intercettazione di piccoli frammenti di materia solida di natura eterogenea, a variabile contenuto elementare, dispersi in atmosfera in forma di fumi, ceneri, polveri, aerosol di origine sia naturale sia antropogenica. Le dimensioni del particolato sono comprese tra frazioni e centinaia di μm . Per gli studi di bioaccumulo Garty e Ammann (1987) suggeriscono che il coefficiente di variazione del contenuto dei metalli in campioni di licheni di una determinata area può essere considerato come una misura delle dimensioni del particolato presente. Un basso coefficiente di variazione indicherebbe una distribuzione omogenea di piccole particelle, mentre un alto coefficiente indicherebbe una deposizione non omogenea dovuta alla presenza di grandi particelle.

Il particolato è osservabile sia all'esterno che all'interno dei talli (Bargagli e Mikhailova 2002). Nel primo caso l'intercettazione è favorita dalla forma di crescita tallina che nella serie crostosa, fogliosa, fruticosa, presenta una progressione verso il massimo dispiegamento della superficie di contatto con l'atmosfera. L'intercettazione è inoltre favorita da superfici scabre ed irregolari per la presenza di strutture vegetative, di propagazione, di riproduzione e di cristalli superficiali di cristalli (per es. la pruina formata da ossalato di calcio), prodotti dall'attività metabolica del micobionte. Questi favoriscono l'intercettazione del particolato per la notevole rugosità indotta della superficie.

La penetrazione delle particelle all'interno del tallo, verificata con osservazioni in microscopia elettronica e in microanalisi (Garty 2000), è favorita da interruzioni della continuità corticale come pseudocifelle, pori, sorali, rotture traumatiche o predisposte per la dispersione di isidi, blastidi, fillidi, schizidi, strutture di propagazione o di ampliamento della superficie.

La complessazione ionica extracellulare riguarda l'immobilizzazione operata da componenti apoplastiche di entrambi i partner simbiotici. Essenzialmente essa riguarda il micobionte che ha la biomassa prevalente nel tallo. Il meccanismo di complessazione ha le caratteristiche di un processo chimico-fisico, basato su uno scambio ionico (vengono liberati protoni): esso è passivo, rapido e reversibile. I metalli vengono complessati a gruppi funzionali carbossilici, aminici e sulfidrilici in ragione della diversa affinità per l'elemento (O, N, S) donatore di protoni, così è possibile costruire scale di affinità che raggruppano gli elementi in tre classi principali: A (Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}), B (Ag^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) e quella dei metalli di transizione ad affinità intermedia (Nieboer e Richardson 1980).

La reversibilità del legame permette fenomeni di competizione e di sostituzione nei siti di complessazione. Ciò ha importanti conseguenze negli studi di bioaccumulo poiché il contenuto degli elementi legati nel tallo riflette di conseguenza principalmente la deposizione atmosferica recente.

Le componenti apoplastiche coinvolte nella complessazione ionica extracellulare sono di diverso tipo:



- Componenti di parete e di matrice cementante le pareti fungine: si tratta di polisaccaridi acidi di tipo pectico che presentano cariche negative di gruppi carbossilici ionizzati (pH-dipendenti) disposte periodicamente. Rappresentano la maggior componente in termini di massa e di superficie disponibile per la complessazione. Esperienze di analisi mirate alla speciazione dei ligandi di Zn e Pb (Sarret et al. 1998) mostrano che in *Xanthoria parietina* tali metalli sono prevalentemente complessati a queste sostanze. Analoghi risultati sono stati ottenuti per il Mn in *Hypogymnia physodes* (Paul et al. 2003).
- Componenti di interfaccia parete-membrana: si tratta di proteine in cui gli elementi donatori sono l'N amminico e lo S dei gruppi sulfidrilici della cisteina. Sono ipotizzati essere coinvolti nella complessazione, ma di difficile distinzione da analoghi ligandi proteici intracellulari (Brown 1987).
- Prodotti del metabolismo secondario del fungo: si tratta di sostanze di tipo fenolico che presentano gruppi funzionali ossidrilici e carbossilici capaci di fenomeni di chelazione. Sono presenti nell'apoplasto corticale e medullare in forme pseudocristalline solide, hanno una bassa solubilità dipendente dalla presenza di gruppi funzionali idrofili. L'acido psoromico e l'acido norstictico (dei depsidoni) sono stati descritti come composti apoplastici complessanti il rame in diverse specie di licheni (Purvis et al. 1987, 1990). In recenti studi di speciazione chimica dei composti complessanti i metalli, la parietina (un antrachinone) sembra avere un ruolo minore per la complessazione del Pb in *X. parietina* (Sarret et al. 1998). Esperienze di diversi autori (Brown 1987, P. Modenesi, pers. comm.) sembrano evidenziare un miglioramento della capacità di accumulo di elementi in traccia in diverse specie di licheni dopo trattamento con acetone che solubilizza queste sostanze.
- Acidi organici secreti dal fungo: diversi acidi organici vengono secreti dal micobionte : malico, citrico, malonico, ossalico. L'acido ossalico riveste una particolare importanza perché forma sali insolubili con diversi elementi quali Ca, Mg, Fe, Pb etc. I cristalli che derivano dalla complessazione sono a deposizione sia corticale sia medullare. Sarret et al. (1998) hanno dimostrato che in *Diploschistes muscorum*, un iperaccumulatore di Zn, il 90% del metallo è complessato come ossalato e che le capacità iperaccumulatrici sono dovute all'aumentata produzione di acido ossalico per l'esposizione in siti contaminati.

La complessazione ionica intracellulare riguarda l'immobilizzazione di ioni, prevalentemente cationi, da parte di componenti simplastiche di entrambi i partner simbiotici. Si tratta di un processo lento, selettivo, energia-dipendente e controllato da canali ionici posti sulla membrana cellulare. Riguarda solo alcuni degli elementi metallici in grado di competere con elementi come il Ca, il Mg, e gli ioni fosfato, ammonio, nitrato etc. Una volta nel simplasto esistono evidenze recenti di sequestro da parte di ligandi come il fosfato e le fitochelatine.

Gruppi fosfato sono presenti come polimeri lineari condensati in forma di granuli detti granuli di polifosfati in cui gli ortofosfato residui sono legati da legami fosfo-anidride (tipo ATP) ad alta energia. Questi granuli sono una forma di riserva del P comune nelle crittogame. I polifosfati sono capaci di complessare cationi (generalmente Ca, K, Mg) ed hanno ruolo nei processi di immobilizzazione di elementi metallici tossici (Giordani & Brunialti 2001). Polifosfati sono presenti nel tallo dei licheni in entrambe i simbionti nelle zone di attiva crescita (margini, strutture di propagazione e di riproduzione). *Lecanora conizaeoides* ed *H. physodes* accumulano Mn nei polifosfati (Paul et al. 2003).

Le fitochelatine sono peptidi contenenti S aventi da 2 a 11 molecole di cisteina. Sono note in alcuni funghi, alghe e piante superiori, la loro sintesi avviene in risposta alla presenza di vari metalli e



metalloidi con cui formano complessi che, almeno nelle piante superiori vengono sequestrati nei vacuoli (Grill et al. 1985).

Pawlik-Skowronska et al. 2002 hanno osservato che Cd, Pb e Zn inducono la sintesi, in bassa concentrazione, di fitochelatine solo nel fotobionte (*Trebouxia*) di *X. parietina*, *Physconia grisea* e *Physcia adscendens*. L'accumulo dei metalli da parte di questi peptidi, rispetto alla porzione accumulata dal micobionte, risulta quasi trascurabile, sia per la bassa concentrazione delle fitochelatine sia per la bassa biomassa (<10%) della popolazione algale, ma ha un significato funzionale importante per l'alga poiché in questo modo vengono bloccati metalli tossici per enzimi plastidiali sensibili come la Rubisco.

In conclusione, se da una parte i licheni presentano comuni meccanismi di accumulo dei metalli, che sono riconducibili alle modalità descritte, dall'altra appare variabile e specie-specifico il peso che le tre modalità hanno nella capacità di accumulo.

Le procedure di campionamento e di determinazione analitica delle concentrazioni di elementi in traccia in licheni epifiti autoctoni sono state proposte tramite linee guida da un gruppo di esperti a livello nazionale, coordinati dalle Università di Trieste e Siena, e successivamente recepite da ISPRA (ex APAT, ex ANPA) alla fine degli anni '90 (Nimis e Bargagli, 1998). Il processo di normazione a livello nazionale è in corso di avviamento presso l'Ente Nazionale di Unificazione (UNI). I principali limiti di tale tecnica consistono nella relativamente elevata quantità di materiale lichenico da prelevare, che, per ragioni di uniformità e rappresentatività dei risultati, deve necessariamente appartenere alla medesima specie macro-foliosa, e nella scelta obbligata dei siti di campionamento in relazione alla presenza e alla localizzazione della specie target. Conseguentemente l'applicabilità di tale tecnica può essere compromessa dalla scarsità di materiale autoctono in siti idonei (non disturbati da fenomeni di alterazione locali), e deve essere quindi verificata mediante sopralluogo approfondito sul territorio, soprattutto in aree piuttosto vaste e soggette ad elevata antropizzazione.

L'inclusione di tale tecnica nel piano di monitoraggio biologico è basata sia sulla sua diffusa applicazione a livello nazionale in casi analoghi, sia sull'esistenza di dati pregressi nell'ambito specifico del territorio di indagine (Scarselli et al., 2003). Secondo una review sullo stato dell'arte in Italia (Loppi, 2006) la maggior quantità di dati disponibili per l'accumulo di elementi in traccia a livello nazionale è riferita alla specie *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr. (Figura 12), a partire dal primo lavoro risalente al 1985 (Bargagli et al., 1985) effettuato attorno agli impianti cloro-soda dell'area industriale di Rosignano Solvay (LI) fino a studi più recenti effettuati in aree ben più estese quali la regione del Veneto (Nimis et al., 2000) o l'alto Pordenonese (Tretiach & Baruffo, 2001; Tretiach & Pittao, 2008).

Il sopralluogo tecnico in area di studio effettuato in data 13/10/2009 ha evidenziato la notevole diffusione sul territorio della specie target, peraltro già utilizzata nello studio del 2003. Inoltre i talli di *X. parietina* sono stati osservati in siti adatti al prelievo dei campioni, spesso in assenza di concomitanti fonti di possibile contaminazione strettamente locale.

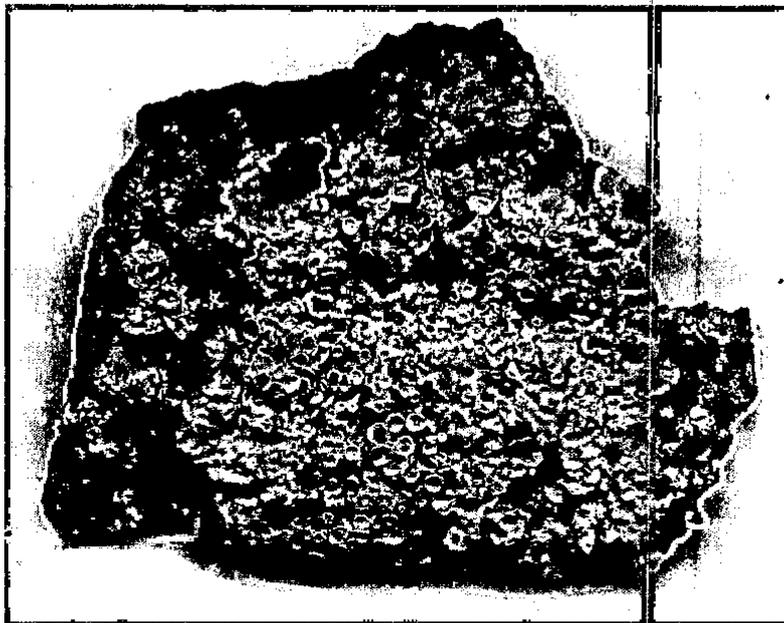


Figura 12 - La specie foliosa a lobi larghi *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr., selezionata come specie target per l'indagine di bioaccumulo di elementi in traccia tramite licheni epifiti autoctoni.

Sulla base di tali osservazioni, e in assenza di norme specifiche standardizzate per la localizzazione delle stazioni di bioaccumulo, si prescrive la localizzazione delle stazioni di prelievo in corrispondenza a quelle selezionate per la bioindicazione tramite licheni epifiti. La procedura di selezione delle unità di campionamento (UC) viene omessa poiché identica a quella sopra riportata (cfr. sezione 4.1). Le prescrizioni specifiche per il caso del bioaccumulo, in merito alla localizzazione degli alberi da cui prelevare i talli di *X. parietina*, sono di riportate di seguito:

- I. Gli alberi sui quali andrà effettuato il prelievo dei talli di *X. parietina* dovranno essere riferiti all'UC corrispondente già selezionata per la bioindicazione. Le linee guida operative (Nimis e Bargagli, 1998) prescrivono di non asportare i talli direttamente dagli alberi sottoposti ai rilievi di biodiversità lichenica, limitatamente alle superfici ove va apposto il reticolo di campionamento di bioindicazione, per evitare che le procedure di bioaccumulo influenzino il dato di I.B.L. Inoltre, le procedure di selezione degli alberi per la bioindicazione prescrivono l'effettuazione del rilievo di bioindicazione su tutti gli alberi standard localizzati entro le UC. Il ritrovamento di alberi idonei al prelievo di *X. parietina*, entro i limiti delle UC, appare quindi poco probabile, e il prelievo comunque limitato alle fasce esterne al reticolo I.B.L. sugli alberi sottoposti ai rilievi di biodiversità lichenica e a quegli alberi che, non essendo in linea con i requisiti di campionabilità per la bioindicazione (e.g. alberi appartenenti a specie non incluse tra quelle selezionate per la bioindicazione) soddisfino contemporaneamente i requisiti di campionabilità previsti dalle linee guida per il bioaccumulo (Nimis e Bargagli, 1998; cfr. p.to II). Pertanto, per garantire maggiore probabilità di un prelievo sufficiente di materiale lichenico, per ogni unità di campionamento è consentito il prelievo di talli della specie target su alberi localizzati esternamente al perimetro dell'UC, entro un raggio di 130 m dal centro (Figura 13), purché situati entro la medesima parcella territoriale che include l'UC, individuata dal poligono, omogeneo per classe di utilizzo del suolo, riportato nella carta dell'uso del suolo del dominio di indagine.

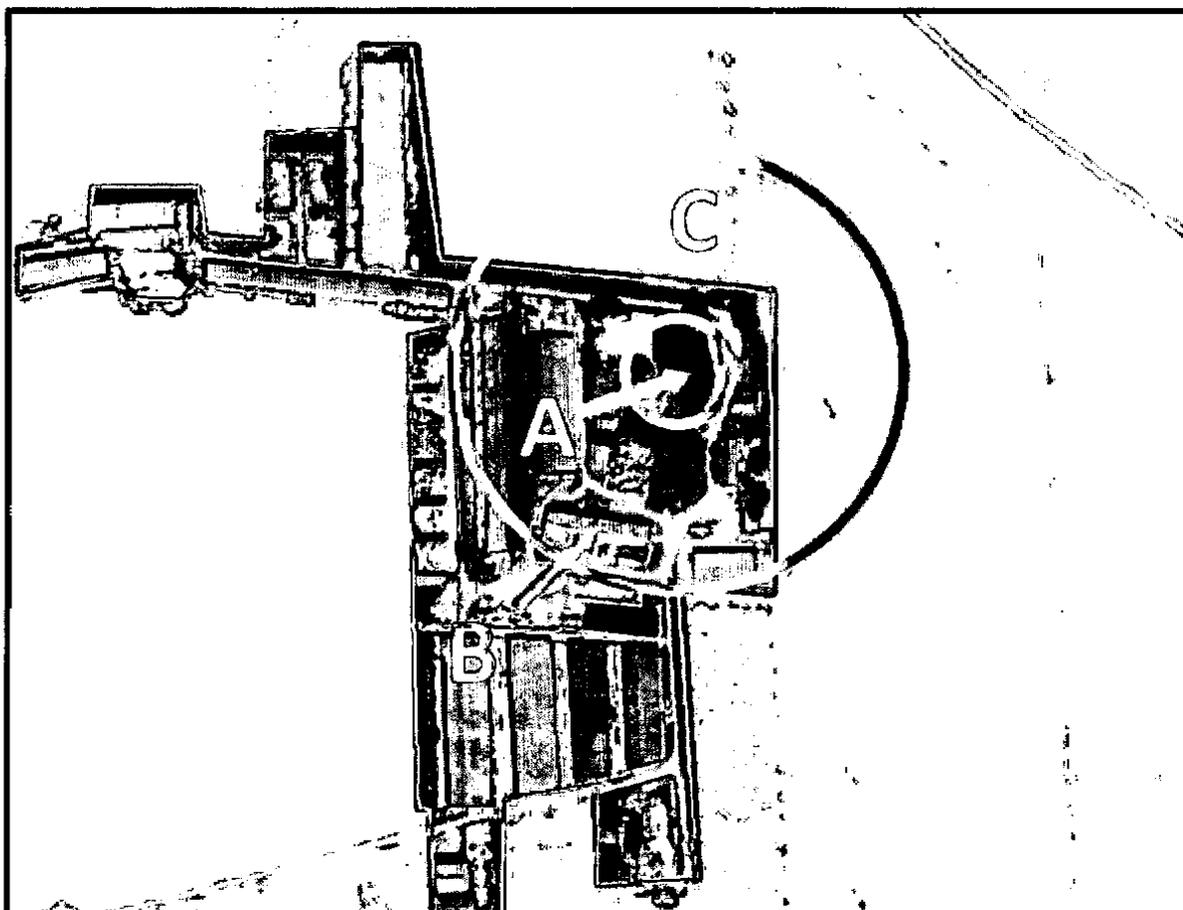


Figura 13 - Esempio di Unità di Campionamento per il bioaccumulo (area circolare esterna) visualizzata in rapporto all'UC per la bioindicazione (area circolare interna) e alla parcella territoriale omogenea per uso del suolo di pertinenza delle UC (poligono non opacizzato). L'immagine si riferisce ad ortofoto a piccola scala e ad UC dello strato "aree industriali e residenziali". La selezione degli alberi avviene prioritariamente nella zona A, ed eventualmente nella zona B. La zona C, appartenente ad altro strato, non deve essere considerata.

- II. Per garantire una sufficiente rappresentatività statistica del campione di materiale lichenico riferito a ciascuna UC, il materiale deve provenire da almeno cinque talli raccolti su non meno di tre alberi diversi. Il primo albero selezionato per il prelievo sarà identificato come il più vicino al centro dell'UC, ed i successivi in ordine crescente di distanza dallo stesso punto. Il numero di alberi da campionare e il numero di talli da prelevare su ciascun albero sono strettamente dipendenti dalla diffusione di *X. parietina* in ciascuna UC, quindi non conoscibili a priori. Si prescrive quindi di procedere iterativamente alla selezione di alberi da sottoporre al prelievo fino al raggiungimento della quantità di materiale lichenico sufficiente. In ogni caso il materiale dovrà consentire, dopo la pulitura (v. p.to IV), di ottenere un campione da sottoporre a determinazione analitica della concentrazione di elementi in traccia, di peso secco all'aria non inferiore a 250 mg .
- III. Il materiale lichenico dovrà essere asportato da superfici di scorza di alberi che presentino le seguenti condizioni:
 - inclinazione del tronco non superiore a 10°;
 - assenza di segni evidenti di disturbo (verniciature, cartelli, chiodi piantati sul tronco, ecc.);

- superfici non fortemente concave e/o sottoposte a periodico scolo d'acqua piovana;
- superfici non decorticate;
- superfici libere da briofite o altri organismi epifiti.

IV. Il prelievo va effettuato tutt'intorno al tronco, ad un'altezza dal suolo compresa tra 1 e 2 m, secondo le seguenti procedure:

- Asportazione delle parti periferiche dei talli, cioè quelle più recenti e con colorazione più chiara della pagina inferiore dei lobi (2 mm dal margine esterno del tallo), utilizzando un coltello di ceramica. Se possibile, questa operazione va effettuata in campo in maniera approssimata (per ridurre al minimo l'impatto sulla biodiversità lichenica); altrimenti il tallo lichenico viene asportato in toto, ed i prelievi vengono effettuati in laboratorio.
- Il materiale asportato va inserito in una busta di carta da filtro, preventivamente analizzata per verificare l'assenza di contaminazione;

V. Il campionamento va effettuato in tutte le UC in condizioni meteorologiche uniformi, durante un arco di tempo il più ristretto possibile e a più di una settimana da eventi di precipitazioni atmosferiche particolarmente intense.

Per ciascuno degli alberi sottoposti al prelievo, dovrà essere compilata e fornita al Committente una scheda monografica analoga a quella sopra descritta per la bioindicazione, riportante tutte le informazioni sopra descritte (cfr. sezione 4.1) ed in aggiunta le seguenti, per ciascun tallo campionato:

- specie di lichene (tassativamente *X. parietina*)
- circonferenza del tronco misurata nel punto di raccolta del tallo
- altezza dal suolo ed esposizione del tallo
- diametro approssimativo del tallo (per talli di forma irregolare considerare il diametro minimo)
- eventuale presenza di danneggiamenti (S: scolorimento del tallo, D: danni meccanici, N: necrosi del tallo). L'intensità del danneggiamento va valutata con la seguente scala: 1 = debole, 2 = medio, 3 = forte.

Dal punto di vista statistico la popolazione di riferimento per lo studio di bioaccumulo tramite licheni epifiti è costituita da Unità di Campionamento identificate da poligoni di uso del suolo iscritti in aree circolari di 130 m di raggio omogenee rispetto allo strato di appartenenza (superficie dell'UC interamente occupata dallo strato di riferimento). Il campione di UC è stato selezionato mediante estrazione casuale di coppie di coordinate geografiche, che definiscono il centro di ciascuna UC. Dal punto di vista biologico la popolazione di riferimento è costituita dalle popolazioni di *Xanthoria parietina* localizzate tra 1 e 2 m dal suolo sui tronchi di alberi standardizzati, localizzati entro le UC.

In caso di assenza di elementi appartenenti alla popolazione, o di impossibilità di prelevare una quantità di materiale sufficiente entro un'Unità di Campionamento, questa sarà considerata non campionabile, e andrà sostituita secondo la procedura già descritta per la bioindicazione (cfr. sezione 4.1, p.to VI).

VI. Preparazione del campione. Per ciascuna UC, il materiale lichenico prelevato costituirà un campione *pooled*, ovvero tutte le porzioni dei talli asportati andranno a costituire un unico campione da sottoporre alla preparazione per il trattamento analitico. In laboratorio, i talli vanno ripuliti al microscopio binoculare per eliminare materiali estranei (residui di corteccia, muschi, ecc.) entro 7 giorni dalla data di prelievo. Va prestata la massima attenzione per evitare ogni tipo di contaminazione da metalli in traccia, ad esempio usando pinzette a punta



piatta teflonate e forbici in ceramica. Anche quando siano state campionate soltanto le parti periferiche dei talli, sarà comunque necessario effettuare in laboratorio una accurata selezione di tutti i frammenti sotto il microscopio binoculare, curando che le distanze dal margine dei talli seguano le norme di cui al punto IV.

VII. Il campione ripulito andrà essiccato (H_2O residua $< 3\%$) per almeno 24 ore in contenitori di polietilene a temperatura ambiente, in quanto l'essiccamento in stufa può determinare la parziale volatilizzazione di alcuni composti con bassa tensione di vapore; alternativamente, si può utilizzare un essiccatore, a temperatura inferiore a $40^\circ C$.

VIII. Successivamente si procederà alla macinazione ed omogeneizzazione del materiale, da effettuarsi con adeguata attrezzatura in agata per limitare l'eventuale contaminazione da elementi metallici. La macinazione deve garantire una granulometria massima di $200 \mu m$. I campioni così preparati dovranno essere conservati in contenitori di polietilene (Eppendorf o bottiglie) sigillati a temperatura ambiente fino al momento dell'analisi.

Tutte le operazioni di preparazione dei campioni per la fase analitica dovranno essere effettuate indossando guanti monouso non talcati, al fine di ridurre le probabilità di contaminazione. Dovrà essere fornito al Committente un report sul trattamento di preparazione dei campioni, che dovrà indicare la data, le specifiche tecniche dei trattamenti (tempi, temperature, contenuto idrico residuo, granulometria) e della strumentazione utilizzata per la ripulitura, l'essiccazione e la macinazione dei campioni.

Gli elementi in traccia da determinare nei campioni, sono stati concordati con il committente sia in base a quelli considerati nello studio del 2003, sia in relazione a quanto previsto dagli studi di monitoraggio chimico-fisico prescritti nell'ambito del piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, in cui rientra il presente studio di biomonitoraggio. Si prescrive la determinazione analitica dei seguenti elementi: Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Zn, V.

Le procedure di determinazione dei contaminanti nei campioni includono una fase di mineralizzazione in soluzione acida, finalizzata alla solubilizzazione degli elementi in traccia, e una fase analitica di determinazione delle concentrazioni degli elementi in soluzione. I punti critici del processo sono principalmente rappresentati dalle tecniche di mineralizzazione, dai metodi di determinazione, e dalla garanzia di qualità del laboratorio di analisi.

La maggior parte dei lavori di bioaccumulo condotti in Italia hanno utilizzato la tecnica di mineralizzazione parziale (HNO_3 oppure $HNO_3 + H_2O_2$) che è caratterizzata da percentuali di recupero (quantità di elemento solubilizzata rispetto alla sua quantità totale presente nella matrice lichenica) variabili in funzione dell'elemento e delle condizioni di mineralizzazione (tempi di mineralizzazione, temperatura, granulometria del materiale macinato etc.). In particolare, la percentuale di recupero risulta decisamente ridotta per alcuni elementi terrigeni (Bargagli, 1998; Bettinelli et al., 2002; Minganti et al., 2003) che normalmente rivestono un ruolo importante nell'interpretazione dei dati di bioaccumulo. Le evidenze sperimentali (e.g. Bettinelli et al., 2002) sul confronto tra protocolli di trattamento trattamenti identici a parte la mineralizzazione parziale ($HNO_3 + H_2O_2$) o totale ($HNO_3 + H_2O_2 + HF$) fornisce indicazioni evidenti sulle differenze di recupero, riportando, per alcuni elementi (Al, Cr, Ti, V), valori variabili tra circa il 50 e il 500%. Inoltre alcune tipologie di particolato di origine antropica (es. ceneri volatili da combustione) non sono mineralizzabili in modo soddisfacente con il solo HNO_3 .

In considerazione di quanto sopra riportato, e raccomandato in letteratura (Quevauviller et al., 1992), si prescrive come metodo di riferimento la mineralizzazione in presenza di acido fluoridrico. Questa tecnica è poco influenzata dalle condizioni di mineralizzazione poiché l'utilizzo di HF consente una



completa dissoluzione di tutte le matrici coinvolte nel processo (materiale lichenico, particolato terrigeno e particolato di origine antropica) aumentando la ripetibilità e la riproducibilità delle misure. Il protocollo analitico prescritto per questa indagine è stato concordato con il Committente CESI, presso il quale è correntemente in uso (metodo specificato in EPA 3052:1996 - Environmental Protection Agency, Method 3052, SW-846, 1996) ed è descritto di seguito in riferimento ai singoli elementi da determinare.

- IX. Mineralizzazione acida dei campioni. I campioni preparati come discusso al p.to VIII andranno sottoposti a mineralizzazione acida in forno a microonde con miscela di acido nitrico (HNO_3 7 ml 65% v/v), fluoridrico (HF 0,2 ml 50% v/v) e acqua ossigenata (H_2O_2 1 ml 30% v/v), secondo la seguente procedura:
- Una quantità accuratamente pesata di campione compresa tra 100 e 250 mg è posta negli appositi contenitori ad alta pressione (max 150 bar) del forno a microonde, possibilmente provvisto di controllo di temperatura. A tale proposito, è opportuno utilizzare sempre contenitori dedicati alla mineralizzazione di campioni a bassa concentrazione di elementi di interesse, evitando, ad esempio, l'utilizzo di contenitori impiegati per la mineralizzazione di altre matrici (e.g. campioni di suolo), per evitare l'“effetto memoria” del Teflon).
 - Nel caso di forno di mineralizzazione sprovvisto di controllo di temperatura, la procedura qui va applicata per la mineralizzazione contemporanea di 6 campioni: con un numero di campioni inferiore occorre riempire con acqua i contenitori in eccesso, poiché la temperatura raggiunta dalla soluzione dipende dal numero di contenitori utilizzati contemporaneamente nel forno a microonde. In tali condizioni (numero di campioni e volume di reagenti) la temperatura dei campioni raggiunge al massimo il valore di 200 °C. Questo accorgimento non è necessario se si dispone di forno a microonde con controllo di temperatura massima, da impostare a 200 °C. I campioni vengono solubilizzati utilizzando il seguente programma termico con ventilazione per tutta la durata del ciclo:

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

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

- X. Analisi strumentale. Le soluzioni campione dovranno essere analizzate mediante tecniche spettroscopiche. In particolare, per i diversi elementi:
- Al, Ba, Ti, Mn, Cr, V, Zn, Fe: spettrometria di emissione al plasma ottico (ICP-OES).
 - Ni, Pb, Cd, Te, Be: spettrometria di emissione al plasma massa (ICP-MS) oppure, in alternativa, GF-AAS con fornetto di grafite.
 - As, Se: assorbimento atomico con fornetto di grafite (GF-ASS) o con svolgimento di idruri (HG-AAS).
 - Hg: assorbimento atomico accoppiato alla tecnica dei vapori freddi (CV-AAS) o analizzatore automatico (AMA 254).

Nel caso del cromo, in presenza di livelli molto bassi di concentrazione, può essere utilizzata anche la tecnica ICP-MS. Le determinazioni sono effettuate sulle soluzioni senza diluizione, nel



caso di ICP-AES e AAS, e sulla soluzione diluita 10 volte nel caso dell'analisi effettuata mediante ICP-MS, per evitare problemi di occlusione meccanica dello strumento dovuta al carico salino elevato.

In Tabella 9 vengono riportate, a scopo indicativo, le condizioni strumentali normalmente utilizzate per le diverse tecniche di determinazione.

Tabella 9 - Specifiche tecniche per analisi mediante ICP-MS (a), ICP-OES (b), HG-AAS e CV-AAS (c) e GF-AAS (d).

a) Parametro	Valore
Potenza	1350 W
Flusso di Ar Plasma	16 l/min
Flusso di Ar Ausiliario	0,9 l/min
Flusso di Ar Nebulizzatore	1 l/min
Flusso di campione	0,8 ml/min
Nebulizzatore	Meinhard
Risoluzione	Normale
Numero di replicati	3
Tempo di lavaggio	40 s
Calibrazione	esterna
Curva	lineare
Potenza	1350 W
b) Parametro	Valore
Potenza	1200 W
Flusso di Ar Plasma	16 l/min
Flusso di Ar Ausiliario	1 l/min
Flusso di Ar Nebulizzatore	1,2 l/min
Flusso di campione	1,5 ml/min
Nebulizzatore	Cross flow
Numero di replicati	3
Tempo di lavaggio	40 s
Calibrazione	esterna
Curva	lineare
c) Parametro	Valore
Volume campione	200-500 µl
Linearità	100 µg/l
Carrier	HCl 10% v/v
Soluzione riducente	NaBH ₄ 0,2% in NaOH 0,05 % v/v1
Flusso di Ar	1 l/min
Numero di replicati	3
d) Parametro	Valore
Modo di atomizzazione	Piattaforma - grafite
Volume campione	20 µl
Modificatore	20 µg di Ni come Ni(NO ₃) ₂ 4 g/l
Fenditura	0,2 nm
Correzione del fondo	Zeeman
Numero di replicati	3
Temperatura di essiccazione	100 °C
Temperatura di incenerimento	1400 °C
Temperatura di atomizzazione	2500 °C
Temperatura di pulizia	2600 °C

Durante le fasi analitiche è fondamentale prevedere l'utilizzo di bianchi sperimentali costituiti dalla sola soluzione acida, per il controllo dell'eventuale inquinamento dei campioni durante la

mineralizzazione e degli apporti di elementi dovuti ai reagenti. Inoltre, prima delle analisi dei campioni, sarà necessario effettuare cicli di mineralizzazione e determinazione con campioni bianchi e campioni di materiale lichenico di riferimento e controllo a contenuto elementare noto e certificato. Si prescrive l'utilizzo del riferimento BCR - CRM 482, che riporta le concentrazioni di Al, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn in materiale della specie *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. Tale riferimento può essere reperito presso European Commission, Community Bureau of Reference, B-1049, Brussels.

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

Dovrà essere fornito al Committente un report sul trattamento di mineralizzazione e determinazione analitica elementare, che dovrà indicare la data, le specifiche tecniche dei trattamenti e della strumentazione utilizzata e delle misure fornite (limiti di precisione e di rilevabilità per ciascun elemento). Il report dovrà includere, oltre alle concentrazioni elementari misurate nei campioni (e nei sottocampioni per lo studio della variabilità locale, v. sotto) le concentrazioni rilevate nei bianchi sperimentali, nel materiale certificato di riferimento.

La variabilità delle concentrazioni degli elementi a livello intra-stazione è un dato imprescindibile per poter fornire una valutazione della precisione delle osservazioni in termini di differenze tra diversi siti di campionamento. Si prescrive pertanto l'effettuazione di tale stima mediante un apposito studio della variabilità locale. Questo dovrà essere basato su analisi elementari eseguite su più sottocampioni in un numero predeterminato di Unità di Campionamento, per poter disporre di più repliche per ciascun elemento per il medesimo sito. A tale scopo sono state identificate a priori due stazioni disposte a distanza differente dalla sorgente putativa, lungo le direttrici di diffusione principali e dei venti prevalenti in ciascuno strato di campionamento ad eccezione della vegetazione naturale e/o arborea (Figura 14). Qui, non essendo stato possibile identificare due siti idonei lungo le direttrici NO e SO (Figura 7), è stata intensificata la densità di campionamento lungo la direttrice O a partire dalla CTE, considerando 3 UC. Il numero totale delle unità di campionamento da considerare per lo studio della variabilità delle concentrazioni elementari a livello intra-stazione ammonta quindi a 21. In ciascuna di queste UC dovranno essere costituiti 4 sottocampioni separati di materiale lichenico, ciascuno da sottoporre al trattamento descritto ai p.ti I-X. In queste UC dovrà quindi essere considerata una quantità di materiale necessario per le analisi pari a 4 volte quella riportata al p.to IX, ovvero pari ad almeno 1000 mg (250 mg x 4 sottocampioni). I 4 sottocampioni saranno prelevati indipendentemente l'uno dall'altro in ciascuna UC. Dal momento successivo al prelievo e per tutta la durata dei trattamenti successivi, i sottocampioni verranno assimilati a campioni indipendenti, ovvero conservati, ripuliti, essiccati, macinati e sottoposti a mineralizzazione separatamente l'uno dall'altro.

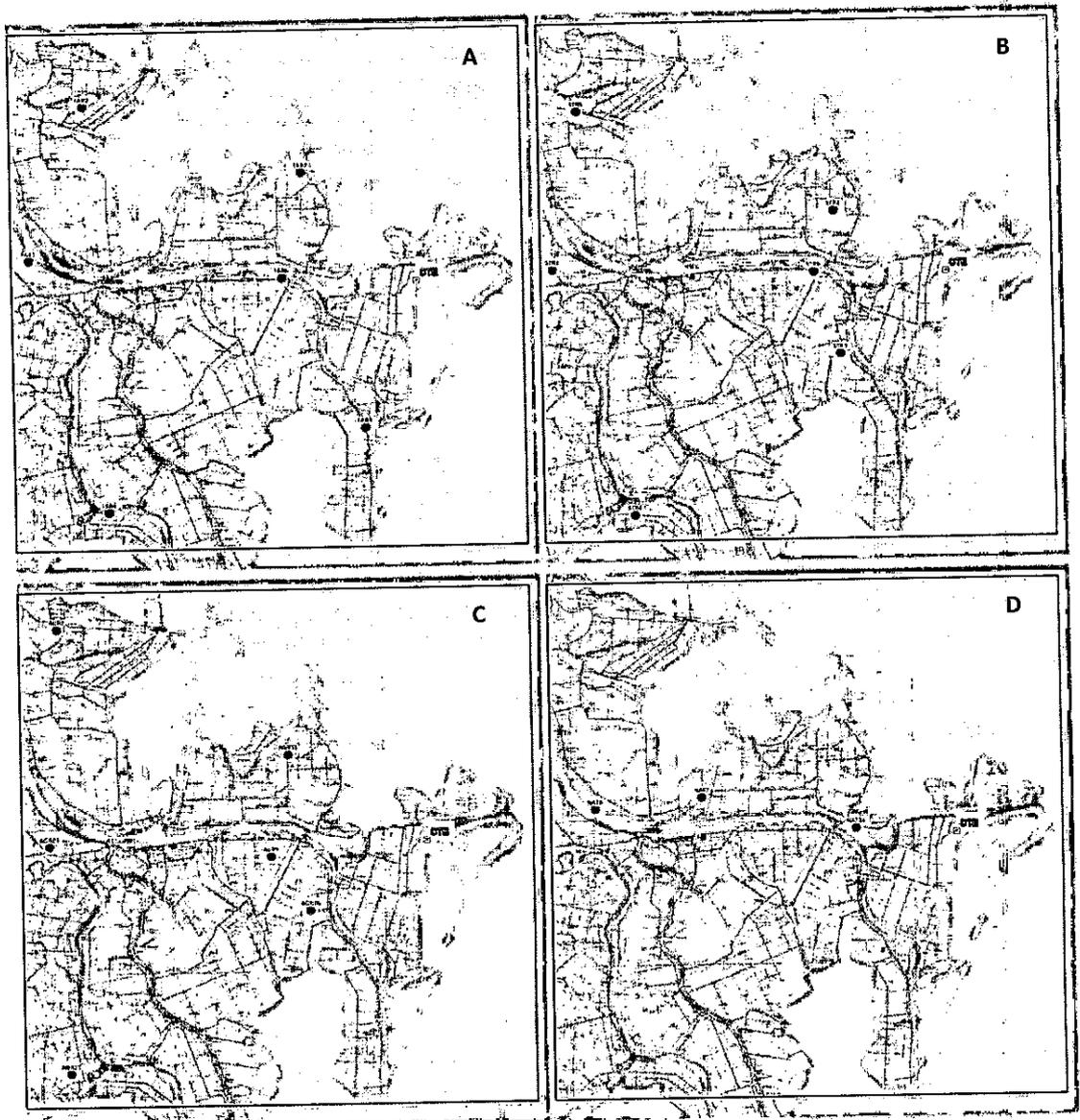


Figura 14 - Localizzazione delle UC selezionate per lo studio della variabilità intra-stazione, suddivise per strato di campionamento: aree industriali e residenziali (A), rete stradale e infrastrutture con territori associati (B), aree delle unità ad uso agricolo (C), vegetazione naturale e colture arboree non da frutto (D) (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009).

Per poter valutare, nei campioni lichenici, il grado di contaminazione di origine atmosferica è necessario isolare ed escludere dal dato di accumulo la frazione elementare di origine terrigena. Tali informazioni potranno essere acquisite mediante analisi dei medesimi elementi in traccia in campioni di suolo superficiale prelevati in corrispondenza di ciascun sito di asporto dei talli lichenici, applicando il seguente protocollo di prelievo (M. Perotti, ined.):

- Raccolta di campioni di suolo superficiale non coperto da vegetazione (suolo nudo potenzialmente sottoposto all'erosione eolica) in ciascuna UC, entro un raggio di 130 m dal centro dell'UC. Ovviamente il campionamento non verrà eseguito in tutte quelle stazioni di

prelievo dei talli lichenici ubicate in aree completamente vegetate, asfaltate o cementate. Qualora sia possibile identificare aree idonee, i punti di prelievo dovranno essere preferenzialmente localizzati in corrispondenza agli alberi sottoposti all'asportazione di talli lichenici, evitando le aree sottochioma.

- Dovranno essere effettuati almeno quattro prelievi di suolo superficiale (sottocampioni). In ciascuna UC, il campione di suolo superficiale sarà formato da aliquote di ogni subcampione, in proporzioni uguali in peso. Nelle UC in cui è previsto lo studio di variabilità del dato di bioaccumulo, sarà effettuata una stima della variabilità del contenuto elementare nei suoli, sottoponendo a determinazione delle concentrazioni elementari i 4 sottocampioni di suolo superficiale separatamente uno dall'altro.
- La conservazione e il trasporto dei campioni e sottocampioni dovrà avvenire dentro sacchetti di plastica inerti per alimenti.
- I campioni e i sottocampioni saranno sottoposti ad essiccazione all'aria o in stufa a 40°C. Si procederà alla preparazione di campioni e sottocampioni a terra fine (< 2 mm) per setacciatura (DM 13/09/1999 Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo" Metodo II.1).
- La frazione a granulometria inferiore ai 200 µm verrà separata e conservata in provette di polistirene fino al momento della determinazione analitica.
- La mineralizzazione verrà effettuata secondo il metodo specificato in EPA 3052:1996 (Environmental Protection Agency, Method 3052, SW-846, 1996).

Per ogni UC, dove sarà possibile effettuare il campionamento dei suoli superficiali, dovrà essere fornito un scheda di raccolta dati riportante le seguenti informazioni:

- stima dell'estensione delle aree nude, espressa in percentuale di copertura dell'UC;
- indicazione della tipologia presunta di azione di risollevarimento del particolato terrigeno (es.: passaggio di automezzi, terreno soggetto a lavorazione agricola, erosione eolica, ecc.).

ELABORAZIONE DEI DATI

Matrici di input

È prevista la compilazione di alcune matrici per l'analisi dei dati:

Talli x Elementi

Questa matrice descrive la distribuzione dei talli raccolti nelle UC, rispetto alle prescrizioni del protocollo di campionamento (non meno di 5 talli raccolti su non meno di 3 alberi all'interno della UC di bioindicazione (A1) oppure entro 130 m dal centro della UC di bioindicazione (A2) o all'esterno di esse, ma all'interno dello stesso poligono di uso del suolo (B).

UC	Area	Albero (codice LDV)	Specie albero	Coordinate E	Coordinate N	Circonferenza tronco	N° Tallo	Esposizione tallo (°)	Altezza dal suolo (cm)	Diametro minimo tallo (cm)	Danneggiamenti tallo: colonie	Danneggiamenti tallo: danni	Danneggiamenti tallo: morti
FAB1	A1	1	Robinia pseudoacacia			65	1	10	120	50	1	1	1
FAB1	A1	1	Robinia pseudoacacia			65	2	3	100	48	1	1	2
FAB1	A1	1	Robinia pseudoacacia			65	3	256	156	61	1	2	1
FAB1	A1	2(1LDV)	Populus nigra			70	4	70	160	70	1	3	1



FAB1	A1	3 (2LDV)	Populus nigra			123	5	90	165	123	3	1	1
FAB2	A1	1 (1LDV)	Populus nigra			200	1	180	200	45	2	1	1
FAB2	A1	2 (2LDV)	Populus nigra			76	2	180	190	57	1	1	1
FAB2	A2	3	Populus nigra			88	3	65	190	78	1	2	3
FAB2	A2	3	Populus nigra			88	4	98	107	100	1	3	3
FAB2	B	4	Populus nigra			97	5	107	156	67	3	1	2
FAB2	B	5	Populus nigra			113	6	330	123	86	1	1	1
....							

UC × Elementi lichene

Contiene i valori delle concentrazioni degli elementi (in ppm) nei campioni *pooled* di *Xanthoria parietina* raccolti nelle UC rilevate.

UC	Al	As	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Ti	Zn	V
FAB01																			
FAB02																			
FAB03																			
FAB04																			
STR08																			
STR09																			
STR10																			
AGR01																			
AGR02																			
AGR03																			
CONTROLLO BCR - CRM 482			X	X		X			X		X	X			X	X	X		X

UC × Elementi suolo

Contiene i valori delle concentrazioni degli elementi (in ppm) nei campioni *pooled* di suolo raccolti nelle UC rilevate.

UC	Al	As	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Ti	Zn	V
FAB01																			
FAB02																			
FAB03																			
FAB04																			
STR08																			
STR09																			
STR10																			
AGR01																			
AGR02																			
AGR03																			

**IntraUC × Elementi lichene**

Contiene i valori delle concentrazioni degli elementi (in ppm) nei campioni *disaggregati* di *Xanthoria parietina* raccolti nelle UC utilizzate per l'analisi della variabilità intra-Unità Campionarie.

UC	Al	As	Ba	Bc	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Ti	Zn	V
AGR7A																			
AGR7B																			
AGR7C																			
AGR7D																			
AGR9A																			
AGR9B																			
AGR9C																			
AGR9D																			
AGR11A																			
AGR11B																			
AGR11C																			
AGR11D																			
AGR24A																			
AGR24B																			
AGR24C																			
AGR24D																			
AGR26A																			
AGR26B																			
AGR26C																			
AGR26D																			
NAT7A																			
NAT7B																			
NAT7C																			
NAT7D																			
NAT8A																			
NAT8B																			
NAT8C																			
NAT8D																			
NAT14A																			
NAT14B																			
NAT14C																			
NAT14D																			
... ETC.																			
CONTROLLO BCR - CRM 482			X	X		X			X		X	X			X	X	X		X

**IntraUC × Elementi suolo**

Contiene i valori delle concentrazioni degli elementi (in ppm) nei campioni *disaggregati* di suolo raccolti nelle UC utilizzate per l'analisi della variabilità intra-Unità Campionarie.

UC	Al	As	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Ti	Zn	V	
AGR7A																				
AGR7B																				
AGR7C																				
AGR7D																				
AGR9A																				
AGR9B																				
AGR9C																				
AGR9D																				
AGR11A																				
AGR11B																				
AGR11C																				
AGR11D																				
AGR24A																				
AGR24B																				
AGR24C																				
AGR24D																				
AGR26A																				
AGR26B																				
AGR26C																				
AGR26D																				
NAT7A																				
NAT7B																				
NAT7C																				
NAT7D																				
NAT8A																				
NAT8B																				
NAT8C																				
NAT8D																				
NAT14A																				
NAT14B																				
NAT14C																				
NAT14D																				
.... ETC.																				

Unità Campionarie x Variabili ambientali

Contiene informazioni a livello di UC delle seguenti variabili ambientali potenzialmente predittive dei valori di concentrazione degli elementi. In particolare:

UC	UTM Est	UTM Nord	Distanza dalla CTE (Km)	Direzione	Estensione aree nude (%)	Tipologia risollevarimento particolato	Moda Danneggiamenti scolorimenti	Moda danneggiamenti necrosi	Moda danneggiamenti danni meccanici	Diametro medio talli (mm)	Peso secco Campione lichene	Strato uso del suolo	Circonferenza media alberi (cm)	Specie arborea
FAB01	290158	4981341	11.8	O	40	Eolica	1	2	3	45	100	FAB	65,3	<i>Populus nigra</i>
FAB02	288678	4979871	13.4	O	50	Lavorazione agricola	1	1	1	120	250	FAB	102,0	<i>Populus nigra</i>
FAB03	286449	4989948	17.8	NO	25	Eolica	2	1	1	80	130	FAB	137,0	<i>Populus nigra</i>
FAB04	301328	4980727	0.8	SO	0	Eolica	2	1	1	FAB	89,0	<i>Populus nigra</i>
STR08	290392	4985333	12.3	ONO	10	Traffico	3	1	1	STR	97,0	<i>Juglans regia</i>
STR09	290036	4972847	14.6	SO	0	Traffico	1	1	1	STR	123,0	<i>Juglans regia</i>
STR10	296988	4977381	6.3	SO	15	Traffico	1	2	1	STR	86,9	<i>Populus nigra</i>
AGR01	301142	4982778	1.8	NO	100	Lavorazione agricola	1	3	1	AGR	65,6	<i>Juglans regia</i>
AGR02	293888	4984629	8.8	ONO	80	Lavorazione agricola	1	1	1	AGR	78,2	<i>Juglans regia</i>
AGR03	298054	4979767	4.2	OSO	75	Lavorazione agricola	1	1	2	AGR	145,0	<i>Populus nigra</i>

Statistiche descrittive

Da applicare a tutte le matrici

Calcolare le seguenti statistiche descrittive:

- N° casi validi
- Media
- Deviazione standard
- Varianza
- Mediana
- Moda
- Quartili
- Min
- Max
- Skewness
- Coefficiente di variazione %.

È richiesta la visualizzazione dei risultati in Tabella e in grafici Box-plot.

Trasformazione dei dati

Preliminarmente alle analisi esplorative sono necessarie alcune procedure di aggiustamento e di trasformazione dei dati delle matrici grezze. Nel testo seguente in sottolineato sono riportate le opzioni di calcolo da applicare alle matrici.

Trattamento di ulteriori dati mancanti

Da applicare a tutte le matrici



Utilizzare la pairwise deletion. Questa tecnica predispone l'analisi in modo da escludere i singoli dati mancanti, senza perdere l'informazione contenuta nel resto del dataset. Opzioni per l'applicazione in automatico della pairwise deletion alle analisi dei dati sono presenti nei più comuni software statistici.

Si faccia riferimento, con gli opportuni adattamenti, all'esempio riportato nel paragrafo della bioindicazione.

Trasformazioni di variabili

Da applicare a tutte le matrici:

Applicare una trasformazione monotonica logaritmica ($b_{ij} = \log(x_{ij})$) alle seguenti variabili ambientali:

- Concentrazioni degli elementi
- Distanza dalla centrale
- Diametro medio dei talli
- Longitudine e Latitudine
- Peso secco campione

Applicare una trasformazione monotonica arcsin * radice quadrata alle seguenti variabili ambientali:

- Estensione aree nude

$$b_{ij} = 2/\pi * \arcsin(\sqrt{x_{ij}})$$

Dove:

b_{ij} = valore relativizzato della concentrazione di un dato elemento j nella UC i

x_{ij} = valore grezzo della concentrazione di un dato elemento j nella UC i

*Una trasformazione monotonica cambia i valori dei dati di una variabile in tutti i casi osservati senza alterare la loro distribuzione per ranghi (McCune et al., 2002). In particolare, la trasformazione logaritmica riduce l'effetto sulle analisi statistiche delle differenze di ordini di grandezza tra e/o all'interno delle variabili della matrice. La trasformazione arcsin * radice quadrata è utilizzata per dati di proporzioni.*

Relativizzazione

Da applicare alle matrici:

- UC x Elementi lichene
- UC x Elementi suolo
- Intra UC x Elementi lichene
- Intra UC x Elementi suolo

Per ogni matrice, calcolare il Coefficiente di Variazione Percentuale (CV%) medio alle colonne delle matrici indicate (→ Concentrazioni degli elementi).

$$CV\% = ((\text{Deviazione standard} / \text{Media}) * 100) / n \text{ elementi nella matrice}$$

Se $CV\% > 100$, applicare alle colonne delle matrici una relativizzazione rispetto ai massimi:

$$b_{ij} = x_{ij} / XMAX_j$$



Dove:

b_{ij} = valore relativizzato della concentrazione di un dato elemento j nella UC i

x_{ij} = valore grezzo della concentrazione di un dato elemento j nella UC i

$XMAX_j$ = valore massimo dell'elemento j nella matrice.

La relativizzazione riscalda le singole righe e/o colonne di una matrice, in base a criteri contenuti nelle altre righe e/o colonne (es. valore massimo). Viene di solito applicata in presenza di elevati valori di coefficiente di variazione % per evitare effetti di distorsione sui risultati delle analisi (Legendre & Legendre, 1998). Nel caso di un'indagine di bioaccumulo è consigliata l'applicazione della relativizzazione rispetto al massimo, perché consente di evidenziare l'eventuale coesistenza in una data UC di picchi di elementi presenti in atmosfera a concentrazioni sensibilmente differenti.

Analisi degli outlier

Da applicare alle matrici:

- UC x Elementi lichene

- UC x Elementi suolo

- Intra UC x Elementi lichene

- Intra UC x Elementi suolo

- UC x Variabili ambientali

Escludere le Unità campionarie con deviazione standard media > 3,0 delle distanze (Coefficiente di correlazione) dalle altre UC.

Si confronti l'esempio di applicazione riportato per la bioindicazione. Nel caso del bioaccumulo si utilizzi però il coefficiente di correlazione come misura di distanza.

**Analisi della variabilità intra-Unità Campionarie**

Da applicare alle matrici:

- IntraUC × Elementi lichene
- IntraUC × Elementi suolo

ATTENZIONE: PER QUESTA ANALISI UTILIZZARE LE MATRICI GREZZE (NON TRASFORMATE, NE' RELATIVIZZATE)

Utilizzare una ANOVA per disegni campionari nidificati impostando come variabili dipendenti ciascuno degli elementi della matrice.

Utilizzare le seguenti variabili categoriche predittive (dalla matrice UC × Variabili ambientali)

- Strato uso suolo
- UC nidificata in "Strato uso suolo" → UC(Strato uso suolo)

Gli effetti devono essere considerato significativo se $p < 0,05$. Un test post-hoc (si consiglia LSD di Fisher) va inoltre applicato per verificare la significatività ($p < 0,05$) delle differenze tra coppie di stazioni e di strati di uso-suolo (es. AGR vs. STR).

Una tabella di statistiche descrittive dovrà essere inoltre presa in considerazione per verificare la variabilità intraUC nelle UC campionate.

Esempio numerico di analisi con software Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., 2007): Data la matrice sottostante:

Subcampione	Elemento (ppm)	UC	strato
1	15	1	FAB
2	18	1	FAB
3	16	1	FAB
4	25	1	FAB
5	8	2	FAB
6	9	2	FAB
7	7	2	FAB
8	13	2	FAB
9	35	3	FAB
10	45	3	FAB
11	60	3	FAB
12	35	3	FAB
13	48	4	AGR
14	49	4	AGR
15	31	4	AGR
16	32	4	AGR
17	34	5	AGR
18	30	5	AGR
19	12	5	AGR
20	28	5	AGR
21	33	6	AGR
22	56	6	AGR
23	38	6	AGR
24	47	6	AGR
25	1	7	NAT
26	3	7	NAT
27	6	7	NAT
28	3	7	NAT
29	9	8	NAT



30	15	8	NAT
31	8	8	NAT
32	7	8	NAT
33	3	9	NAT
34	3	9	NAT
35	2	9	NAT
36	12	9	NAT

Calcolare le statistiche descrittive

	Level of Factor	Level of Factor	N	Mean Elemento	Std.Dev Elemento	Std.Err Elemento	-95,00% Elemento	+95,00% Elemento
Total			36	16,00000	13,39936	2,233227	11,46631	20,53369
UC(strato)	1	FAB	4	18,50000	4,50925	2,254625	11,32478	25,67522
UC(strato)	2	FAB	4	9,25000	2,62996	1,314978	5,06515	13,43485
UC(strato)	3	FAB	4	43,75000	11,81454	5,907270	24,95043	62,54957
UC(strato)	4	AGR	4	15,00000	4,08248	2,041241	8,50386	21,49614
UC(strato)	5	AGR	4	26,00000	9,66092	4,830459	10,62732	41,37268
UC(strato)	6	AGR	4	13,50000	10,47219	5,236093	-3,16358	30,16358
UC(strato)	7	NAT	4	3,25000	2,06155	1,030776	-0,03039	6,53039
UC(strato)	8	NAT	4	9,75000	3,59398	1,796988	4,03118	15,46882
UC(strato)	9	NAT	4	5,00000	4,69042	2,345208	-2,46350	12,46350
strato	FAB		12	23,83333	16,65606	4,808190	13,25058	34,41609
strato	AGR		12	18,16667	9,68441	2,795650	12,01348	24,31985
strato	NAT		12	6,00000	4,34846	1,255292	3,23712	8,76288

Calcolare gli effetti mediante test di ANOVA per disegni nidificati.

Type III decomposition	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9216,000	1	9216,000	194,8567	0,000000
UC(strato)	3014,333	6	502,389	10,6222	0,000005
strato	1992,667	2	996,333	21,0658	0,000003
Errore	1277,000	27	47,296		

Applicare il test post-hoc Tukey HSD tra UC; variabile Elemento. In grassetto le differenze statisticamente significative.

Error: Between MSE = 47,296, df = 27,000

ID	UC	strato	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		Media	18,500	9,2500	43,750	15,000	26,000	13,500	3,2500	9,7500	5,0000
1	1	FAB		0,618128	0,000653	0,998067	0,825911	0,979462	0,082306	0,682211	0,169137
2	2	FAB	0,618128		0,000153	0,953590	0,041870	0,992673	0,941394	1,000000	0,992673
3	3	FAB	0,000653	0,000153		0,000217	0,026050	0,000178	0,000152	0,000154	0,000152
4	4	AGR	0,998067	0,953590	0,000217		0,397615	0,999997	0,315547	0,972489	0,520846
5	5	AGR	0,825911	0,041870	0,026050	0,397615		0,244781	0,002133	0,052739	0,005151
6	6	AGR	0,979462	0,992673	0,000178	0,999997	0,244781		0,488997	0,996861	0,713297
7	7	NAT	0,082306	0,941394	0,000152	0,315547	0,002133	0,488997		0,911014	0,999989
8	8	NAT	0,682211	1,000000	0,000154	0,972489	0,052739	0,996861	0,911014		0,985040
9	9	NAT	0,169137	0,992673	0,000152	0,520846	0,005151	0,713297	0,999989	0,985040	

Tra gli altri effetti, è evidente la concentrazione significativamente maggiore dell'elemento nella UC3 rispetto a tutte le altre UC.



Analisi multivariate esplorative

Analisi gerarchica dei gruppi (hierarchical clustering)

Da applicare alle matrici

- Unità Campionarie × Elementi lichene

- Unità Campionarie × Elementi suolo

N.B. va realizzata un'analisi dei gruppi di Unità Campionarie e un'analisi dei gruppi degli Elementi (previa trasposizione della matrice, laddove il software lo richieda).

Benchè siano possibili diverse combinazioni di misure di distanza e metodo di unione, sulla base di una revisione bibliografica dei vantaggi e svantaggi dei metodi più comunemente utilizzati in lavori di biomonitoraggio, si suggerisce di utilizzare i seguenti criteri:

Misura di distanza

È suggerito l'utilizzo del Coefficiente di correlazione di Pearson. Quando utilizzato come misura di distanza viene riscalato tra 0 e 1 secondo

$$r_{\text{distance}} = (1 - r) / 2$$

Da un punto di vista geometrico, il coefficiente di correlazione r è il coseno di α , dove α è l'angolo tra le rette che collegano le coordinate di due elementi della matrice al centroide dei casi nello spazio delle variabili (in questo caso UC × Elementi).

Linkage method

Va utilizzato il metodo del Flexible Beta (con $\beta = -0.25$).

Si confrontino le note sull'utilizzo della Flexible Beta nel paragrafo della bioindicazione.

Rappresentazione grafica del dendrogramma

Numerosi software statistici danno la possibilità di visualizzare il dendrogramma di classificazione, fornendo spesso numerose opzioni grafiche. Tra le numerose opzioni, vanno obbligatoriamente riportate nel report finale

- I livelli di taglio del dendrogramma e i gruppi conseguentemente costituiti.
- La distanza effettiva ai diversi livelli di cluster.
- La varianza spiegata (e/o l'informazione rimasta) al livello di taglio selezionato nella formazione dei gruppi.

Criterio di individuazione dei gruppi e valutazione delle differenze tra gruppi di elementi

Per valutare le differenze delle concentrazioni degli elementi nei diversi gruppi di UC è consigliabile l'applicazione della ANOVA di Kruskal-Wallis.

Vanno impostati i seguenti parametri:

- Variabili dipendenti: ciascuno delle variabili della matrice (Elementi)
- Variabili predittive categoriale: gruppi (da hierarchical clustering, ai diversi tagli del dendrogramma selezionati. Va effettuata un'analisi per ogni taglio).

È da considerare la migliore divisione in gruppi quella che fa registrare (per il maggior numero di elementi) il valore minore di probabilità (p , con almeno $p < 0,05$) della significatività delle differenze tra concentrazioni del dato elemento tra i gruppi.

Esempio: data la matrice

	Elemento1	Taglio1	Taglio2
UC1	15	1	1
UC2	21	1	1
UC3	23	1	1
UC4	25	1	1
UC5	8	1	1
UC6	12	2	2
UC7	7	2	2
UC8	13	2	2
UC9	34	2	3
UC10	45	2	3
UC11	60	2	3
UC12	35	3	4
UC13	25	3	4
UC14	49	3	4
UC15	31	3	4
UC16	32	3	5
UC17	34	3	5
UC18	30	3	5

Il taglio1 del dendrogramma ha individuato 3 gruppi di UC, mentre il Taglio2 5 gruppi.

Variabile Dipendente: Elemento1

Kruskal-Wallis test: $H(2, N=18) = 4,662631$ $p = ,0972$

Taglio1	N Casi validi	Somma dei ranghi
1	5	28,50000
2	6	55,50000
3	7	87,00000

Le differenze di concentrazione dell'elemento1 mediante il Taglio1 non sono significative ($p > 0,05$).

Variabile Dipendente: Elemento1

Kruskal-Wallis test: $H(4, N=18) = 13,87117$ $p = ,0077$

Taglio2	N Casi validi	Somma dei ranghi
1	5	28,50000
2	3	8,00000
3	3	47,50000
4	4	51,50000
5	3	35,50000

Viene selezionato il livello di Taglio2 che ha portato alla formazione di 5 gruppi di UC con differenze significative ($p < 0,05$) di concentrazione dell'elemento1.

Fase interpretativa

Si proceda in maniera analoga a quanto descritto nel paragrafo della bioindicazione.

Ordinamento

Da applicare alle matrici:

UC x Elementi lichene vs. UC x Variabili ambientali
 UC x Elementi suolo vs. UC x Variabili ambientali



È suggerito l'utilizzo del global Nonmetric Multidimensional Scaling (NMS o MDS).

Si vedano le note su NMS nel paragrafo della bioindicazione.

Impostazione dell'analisi

Anche in questo caso numerosi software statistici sono in grado di eseguire in automatico i complessi passaggi di calcolo richiesti da questa tecnica. Tuttavia, va posta molta attenzione ad alcuni passaggi che richiedono la scelta dell'operatore. Il setting illustrato nella lista sottostante fa riferimento al software PC-ORD (MJM software - Mc Cune & Mefford, 1999). Altri software possono presentare impostazioni leggermente diverse, in ogni caso vanno obbligatoriamente seguite le raccomandazioni sottolineate nell'elenco successivo. A seguito dell'analisi, nel report andranno riportate le seguenti informazioni:

- Misura di distanza (Coefficiente di correlazione; cfr. paragrafo sul hierarchical clustering).
- Software utilizzato.
- Numero di dimensioni della soluzione finale (solitamente ≤ 3)
- Stress (è accettabile uno Stress < 20)
- Risultati del Monte Carlo test (stress della soluzione finale vs. stress in n iterazioni randomizzate - $p < 0,05$).
- Numero di iterazioni della soluzione finale (40 sulla matrice originale; 50 randomizzate).
- Stabilità della soluzione finale ($< 1 \cdot 10^{-4}$).
- Eventuali rotazioni dell'ordinamento rispetto ad una variabile predittiva (es. Varimax rotation).
- Proporzione di varianza rappresentata in ciascun asse dell'ordinamento (in termini di r^2 tra la distanza nello spazio dell'ordinamento e quella nel dataset originale).
- Correlazioni (Pearson r) delle variabili predittive con gli assi dell'ordinamento.
- Correlazioni (Pearson r) degli elementi con gli assi dell'ordinamento.

Rappresentazione grafica dell'ordinamento

Nel report finale vanno riportati:

- Rappresentazione grafica degli assi per tutte le dimensioni selezionate (es. Asse 1 vs. Asse 2 e asse 1 vs. asse 3 nel caso di una soluzione finale 3-dimensionale): ordinamento degli elementi e delle UC.
- Varianza rappresentata da ciascun asse.
- Joint plot delle variabili predittive.
- Categorizzazione delle UC plottate nell'ordinamento, rispetto ai gruppi individuati dalla precedente cluster analysis e rispetto alla stratificazione per uso del suolo.

Fase interpretativa

Vanno riportate e discusse le relazioni tra assi, specie licheniche e variabili predittive ambientali. L'interpretazione dei risultati dell'ordinamento dovrà essere basata sul valore e sulla significatività delle correlazioni tra gli assi dell'ordinamento e gli elementi, gli assi dell'ordinamento e le UC, e gli assi dell'ordinamento e le variabili ambientali (es. distanza e direzione CTE, specie arborea, ...), calcolata, caso per caso, come livello di probabilità associata ai valori del coefficiente di correlazione forniti dall'NMS. Per gli obiettivi di questo lavoro, vanno considerate rilevanti le correlazioni (Pearson r) > 0,300 con $p < 0,05$.

Confronto tra le concentrazioni elementali nei licheni e nel suolo

Da applicare alle matrici:
- UC x Elementi lichene
- UC x Elementi suolo

Per verificare la congruenza tra i pattern di concentrazioni elementali nel suolo e in *Xanthoria parietina* va applicato il **Mantel test** (Mantel, 1967).

Il test è applicabile su matrici della stessa dimensione: si deve quindi provvedere a eliminare (ai soli fini di questa analisi) eventuali UC e/o elementi che non siano comuni alle 2 matrici.

Il Mantel test verifica la significatività della correlazione tra 2 matrici, confrontando quest'ultima con quelle ottenibili da permutazioni ripetute di righe e colonne all'interno delle matrici stesse (McCune et al., 2002).

Dopo ciascuna permutazione, viene calcolata una **Statistica standardizzata di Mantel (Z)**. Z è la somma dei prodotti corrispondenti agli elementi fuori dalla diagonale delle due matrici (McCune et al., 2002). Per valutare la significatività di Z, viene utilizzato il metodo di **approssimazione asintotica di Mantel**, che trasforma la statistica Z in una distribuzione t. In alternativa si può applicare un Monte Carlo test. Sono considerati significativi effetti con $p < 0,05$.

Viene inoltre calcolata r, la Statistica standardizzata di Mantel, che è il coefficiente della correlazione di Pearson tra le due matrici.

Questi ultimi passaggi sono calcolati in automatico dai software che implementano il Mantel test.

Esempio numerico: date le matrici

Matrice UC x Elementi lichene

	EL1L	EL2L	EL3L	EL4L	EL5L
UC1	87	100	23	21	9
UC2	78	90	57	43	5
UC3	25	12	6	17	5
UC4	23	13	10	6	7
UC5	10	2	3	1	9

Matrice UC x Elementi suolo

	EL1S	EL2S	EL3S	EL4S	EL5S
UC1	90	113	28	23	11
UC2	81	88	51	41	8
UC3	13	14	7	19	3
UC4	15	15	11	5	3
UC5	21	9	15	7	4

Distance measure for first matrix = Correlation

Distance measure for second matrix = Correlation

Row	Column	Matrix1	Matrix2
2	1	0.24094200	0.19316870
3	1	0.46368954	0.54979110
3	2	0.48618343	0.48273596
4	1	0.33832473	0.23400958
4	2	0.40749192	0.15197700
4	3	0.37970844	0.60583532
5	1	0.68623704	0.52127129
5	2	0.79468167	0.42306533
5	3	0.62872946	0.66027814
5	4	0.48749188	0.35679275



Statistica del Mantel test: distribuzione t con infiniti gradi di libertà

(approssimazione asintotica di Mantel, 1967)

Se $t < 0$, presenza di un'associazione negativa tra le due matrici.

Se $t > 0$, presenza di un'associazione positiva tra le due matrici.

Statistica standardizzata di Mantel: $r = 0.507759$

Z Osservato = $0.4381E+01$

Z Atteso = $0.4107E+01$

Varianza di Z = $0.5195E-01$

Errore Standard Z = $0.2279E+00$

t = 1.2021

p = 0.22971994

Esiste un'associazione positiva tra la matrice UC x Elementi lichene ed UC x Elementi suolo, ma non è statisticamente significativa.

INTERPRETAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE SPAZIALE DEI DATI DI BIOACCUMULO

Scale di interpretazione

Per fornire uno strumento utile a valutare il grado di alterazione ambientale espresso dalle concentrazioni di elementi in traccia nei talli lichenici, Nimis e Bargagli (1999) hanno proposto scale interpretative basate sull'analisi di centinaia di misure effettuate in Italia su licheni fogliosi epifiti, in aree con diverse situazioni geomorfologiche, con diversi tassi di inquinamento, e seguendo procedure simili a quelle da essi suggerite nella medesima pubblicazione. Tali scale, una per ogni elemento, si basano su analisi della distribuzione di frequenza dei valori di concentrazione relativi a 17 elementi con almeno 100 misure effettuate in almeno tre aree diverse del Paese. Vengono inoltre consigliati colori ed espressioni verbali per la visualizzazione e l'interpretazione dei risultati. I

Successivamente, uno studio condotto presso l'ex Dipartimento di Biologia (attualmente Dipartimento di Scienze della Vita) dell'Università di Trieste (Nimis et al., 2001) è iniziata un'opera di raccolta di dati disponibili in letteratura su studi di bioaccumulo effettuati in Italia mediante licheni fogliosi epifiti. È stata implementata una banca dati in cui, per ogni studio, oltre ai singoli valori di concentrazione elementari, sono state considerate, ove presenti, le seguenti informazioni: a) riferimento bibliografico, b) localizzazione geografica dell'area di studio, c) numero di stazioni, d) anno di raccolta dei campioni, e) specie lichenica usata, f) modalità di raccolta ed analisi dei campioni, g) i valori minimo, massimo, la media e la deviazione standard dei valori di concentrazione. Ciò ha permesso di compiere ulteriori elaborazioni e di aggiornare la scala.

Per ciascun elemento, la costruzione della scala interpretativa è basata sulla seguente procedura:

- estrazione dei valori di concentrazione relativi all'elemento;
- calcolo della distribuzione di frequenza e di alcuni valori percentili, dallo 0 (valore minimo) al 100° (valore massimo);
- suddivisione del range di variabilità dei dati in 7 classi, i cui valori limite inferiori corrispondono, rispettivamente, al minimo, 20°, 50°, 75°, 90°, 95° e 98° percentile della distribuzione di frequenza dei dati di concentrazione presenti nella banca dati, secondo lo schema riportato in Tabella 10;
- attribuzione, a ciascuna classe, di un colore e di un'espressione verbale, indicativi del livello dei valori inclusi in ciascuna classe, in relazione al range di variabilità complessivamente osservato per



l'elemento considerato (Tabella 10).

Tabella 10 - Scale interpretative per il bioaccumulo basato su licheni epifiti autoctoni, proposte da Nimis e Bargagli (1999) e aggiornate da Nimis et al (2001).

n° misure		626	435	350	223	626	654	656	647	606
percentili	definizioni	Al	As	Ba	Be	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg
20°	1 - Alterazione assente o trascurabile	<350	<0,2	<3,3	<0,04	<0,2	<1,2	<7,0	<290	<0,07
50°	2 - Alterazione molto bassa	600	0,6	6,0	0,08	0,4	2,2	10,0	500	0,13
75°	3 - Alterazione bassa	1000	1,2	10,0	0,12	0,8	4,0	15,0	800	0,20
90°	4 - Alterazione media	1600	1,9	18,0	0,60	1,4	6,0	25,0	1200	0,29
95°	5 - Alterazione alta	2500	2,4	25,0	0,70	2,0	9,0	34,0	1500	0,42
98°	6 - Alterazione molto alta	3200	3,0	35,0	1,15	2,6	16,0	53,0	1800	0,74
	7 - Alterazione estrema	3200	>3,0	>35,0	>1,15	>2,6	>16,0	>53,0	>1800	>0,74
max Italia		8390	5,5	78,7	1,62	9,0	60,5	161,0	4276	1,84

n° misure		649	655	699	219	198	138	416	699
percentili	definizioni	Mn	Ni	Pb	Se	Te	Ti	V	Zn
20°	1 - Alterazione assente o trascurabile	<20	<1,0	<4,0	<0,04	<0,05	<13	<0,6	<30
50°	2 - Alterazione molto bassa	25	2,0	10,0	0,15	0,15	27	1,7	40
75°	3 - Alterazione bassa	35	3,0	25,0	0,30	0,35	70	3,1	65
90°	4 - Alterazione media	60	5,0	55,0	0,40	0,52	97	5,1	94
95°	5 - Alterazione alta	90	6,0	80,0	0,70	0,62	113	6,7	115
98°	6 - Alterazione molto alta	140	8,0	108,0	0,90	0,77	150	9,3	155
	7 - Alterazione estrema	>140	>8,0	>108,0	>0,90	>0,77	>150	>9,3	>155
max Italia		685	34,4	494,0	1,43	2,32	290	15,0	358

Le scale fornite in Tabella 10 costituiscono, come sottolineato dagli stessi autori che le hanno proposte, una prima approssimazione di uno strumento interpretativo potenzialmente molto efficace, e la loro predittività va intesa in progressivo miglioramento solo sulla base di un continuo aggiornamento in seguito all'acquisizione di nuovi dati. Essa non può quindi essere utilizzata acriticamente.

Ai fini degli obiettivi del piano integrato di monitoraggio biologico, la corrispondenza diretta tra valori di concentrazione registrati in fase di gestione del piano e le classi di attribuzione secondo le scale fornite, non deve essere effettuata. Tale prescrizione si fonda proprio sul carattere assolutamente preliminare dello strumento, che è potenzialmente informativo, ma, al momento e secondo le indicazioni degli stessi autori, non è probabilmente esaustivo. Deriva infatti da un'opera di raccolta attualmente ancora in corso e, con l'aumento dei dati disponibili, i limiti inferiore e superiore di ciascuna classe potrebbero deviare da quanto proposto. Cambiando i limiti potrebbe variare anche la classe cui un dato valore di concentrazione viene attribuito, e con essa l'interpretazione dello stesso dato. Non si ritiene quindi di raccomandare l'utilizzo pedissequo nell'ambito del progetto esecutivo.

Inoltre le scale vanno intese come termine di confronto a carattere estremamente generale, poiché presentano alcuni aspetti ancora problematici: sono basate su misure relative a diverse specie di licheni epifiti fogliosi a lobi larghi, ovvero *Parmelia spp.* e *Xanthoria parietina*. Gli stessi autori delle scale sconsigliano che nell'ambito di uno stesso studio possano essere utilizzati indifferentemente campioni derivanti da diverse specie licheniche, in virtù delle conoscenze ancora scarse e talvolta contraddittorie sulle capacità di bioaccumulo nelle diverse specie (Bargagli et al., 1987; Freitas & Nobre, 1997; Nimis et al., 2001; Tretiach & Baruffo, 2001; Minganti et al., 2003). A maggior ragione, evitando l'uso di dati derivanti da specie diverse nell'ambito dello stesso studio, si deve evitare il confronto acritico tra i dati riferiti a *Xanthoria parietina* (utilizzata nel piano di monitoraggio) e valori derivanti da diverse specie su tutto il territorio nazionale. La costruzione di scale basate sui soli dati riferiti a *X. parietina* potrebbero risolvere la questione solo in parte, poiché le misure disponibili costituiscono un dataset di dimensioni più ridotte rispetto alla banca dati generale, e meno rappresentativi della variabilità geografica a scala nazionale.

Un'ulteriore specifica delle scale, che ne riflette il carattere preliminare, è che esse non distinguono, nelle distribuzioni di frequenza, i valori di concentrazione in base al tipo di protocollo sperimentale



utilizzato per la determinazione analitica. Questo va considerato soprattutto in relazione al processo di mineralizzazione (v. p.to IX) che può costituire, in aggiunta ai fattori ambientali (specie lichenica, parametri climatici, condizioni ecologiche) una delle sorgenti di variabilità del dato finale di concentrazione.

Infatti, una frazione cospicua delle misure contenute nella banca dati utilizzata per l'elaborazione delle scale, include misure basate su mineralizzazione parziale (trattamento con HNO_3). Questa pratica, rispetto a trattamento con acidi forti, può comportare una diminuzione della percentuale di recupero, alla cui quantificazione esatta tuttavia non sono attribuibili, per tutti gli elementi considerati in questo studio, valori numerici esatti. Nell'ambito del presente lavoro, data la prescrizione del protocollo di mineralizzazione con acido forte, applicare pedissequamente le scale significherebbe attribuire alle concentrazioni elementari, indipendentemente dalla loro entità, un livello di alterazione probabilmente sovrastimato. D'altra parte al momento non è possibile realizzare scale ad-hoc, considerando solo le misure derivanti dal medesimo protocollo analitico prescritto per questo studio, a causa della loro esiguità numerica, che ne inficia la rappresentatività delle distribuzioni di frequenza.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, si prescrive l'utilizzo delle scale in Tabella 10 come strumento complementare di analisi dei dati, prescrivendone l'utilizzo su base esclusivamente descrittiva. Lo scopo è fornire un inquadramento generale delle concentrazioni elementari osservate durante la fase gestionale, confrontandole con quanto generalmente riscontrato in studi pregressi a livello nazionale, sottolineando il carattere puramente indicativo di tale confronto.

L'interpretazione dovrà essere tuttavia confermata dai risultati delle elaborazioni statistiche. Qualora questi fornissero indicazioni contrastanti rispetto all'informazione descrittiva derivante dalle scale, si privilegerà l'inferenza statistica, e, quindi il criterio probabilistico, rispetto a quello descrittivo.

Fattori di arricchimento

Utilizzando le matrici

UGx Elementi lichene
UGx Elementi suolo

Per entrambe le tecniche di bioaccumulo (licheni autoctoni e trapianti), va calcolato il fattore di arricchimento per ogni elemento, in modo da avere un'ulteriore valutazione del contributo terrigeno rispetto a quello atmosferico. Secondo Bargagli (1998) il fattore di arricchimento (Enrichment Factor – EF) è calcolato confrontando nel lichene e nel suolo il rapporto tra la concentrazione di un dato elemento e quella di un elemento estremamente abbondante nel suolo (solitamente Al o Ti), secondo la formula:

$$EF_{Al \text{ or } Ti} = \frac{\left(\frac{C_x}{C_{Al \text{ or } Ti}} \right)_{\text{in lichen}}}{\left(\frac{C_x}{C_{Al \text{ or } Ti}} \right)_{\text{in soil}}}$$

Dove C_x = la concentrazione di ogni singolo elemento x

C_{Al} = Concentrazione di Al

C_{Ti} = Concentrazione di Ti

Valori di $EF \gg 1$ suggeriscono un contributo prevalentemente atmosferico di deposizione di un dato elemento. I valori dei fattori di arricchimento per i singoli elementi e Unità Camponarie vanno tenuti in considerazione in sede di discussione dei risultati delle analisi precedenti.



SCHEMA TEMPORALE DI ESECUZIONE

A fini del piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, le indagini di biomonitoraggio con licheni epifiti come bioaccumulatori andranno effettuate a partire dalla fase iniziale delle attività di costruzione per un totale di quattro campagne di rilievi da effettuare nell'arco di dieci anni (una campagna di rilievi ogni tre anni). In analogia con quanto osservato relativamente all'indagine di bioindicazione, la prima campagna dovrà essere considerata uno studio pilota, teso all'ottimizzazione della rete di monitoraggio per le campagne successive.



3.3. BIOACCUMULO TRAMITE TRAPIANTI DI LICHENI EPIFITI.

Le tecniche descritte in precedenza (cfr. sezioni 4.1 e 4.2) forniscono informazioni sul pattern di diffusione di alcuni inquinanti atmosferici e sugli effetti di alterazione che questi provocano sulla componente biotica sensibile dell'ecosistema, in particolare su organismi autoctoni (i.e. naturalmente presenti in situ) per un periodo temporale medio-lungo e in un ambito territoriale generalizzato ad aree omogenee dal punto di vista ecologico.

Le indagini basate sul trapianto attivo di organismi bioaccumulatori consentono invece di riferire le concentrazioni degli inquinanti target a periodi temporali più brevi e definiti con precisione, secondo un disegno espositivo dei campioni che può tenere in considerazione fattori quali la collocazione della sorgente putativa, la direzione dei venti prevalenti, le condizioni macroclimatiche prevalenti ecc. Inoltre l'utilizzo di trapianti consente studi ripetuti con maggiore frequenza nel tempo, offre l'opportunità di disporre di materiale di partenza omogeneo, di cui si conosce la composizione elementare pre esposizione.

La possibilità di installare attivamente le stazioni di monitoraggio senza il vincolo della naturale presenza dei biosensori sul territorio consente di pianificare strategie di campionamento ad hoc in riferimento al contesto territoriale di applicazione ed agli obiettivi del monitoraggio. Nel caso in oggetto, si propone l'utilizzo mirato di stazioni di bioaccumulo attivo dispiegate lungo transetti disposti sulle direttrici principali di diffusione e avente origine comune in corrispondenza del camino della CTE. Tale geometria di localizzazione delle stazioni può fornire sia uno strumento di validazione della modellistica chimico-fisica, sia l'esclusione di fenomeni di impatto ambientale, in assenza di evidenti gradienti di deposizione lungo i transetti. La definizione dei transetti è stata predisposta utilizzando i risultati della modellistica diffusionale CALPUFF e le serie storiche dei dati anemometrici rilevati a terra. La modellistica diffusionale della CTE fornita dal Committente individua una direttrice principale di distribuzione degli inquinanti, orientata in direzione ovest rispetto al camino con delle componenti minori a ONO e SO legate ai venti predominanti. Per maggiori dettagli si rimanda alla sezione 3.

Da un'analisi della direzione e frequenza dei venti misurati a terra dalla stazione meteo di Pradon-Porto Tolle [dati forniti dal Centro Meteorologico di Teolo (PD) di A.R.P.A. Veneto] basata sulla serie storica di misure orarie 1998-2008, è risultato evidente un andamento anemometrico tipicamente stagionale, con interessanti dinamiche lungo tre assi principali: NE-SO, E-O, SE-NO (Figura 15). Lungo l'asse NE-SO, si osserva un'elevata frequenza dei venti provenienti da NE (Bora) con una minima diminuzione invernale della frequenza, cui corrisponde un aumento della velocità media rispetto all'estate. Più marcata la differenza stagionale lungo il transetto E-O, che individua in estate una netta predominanza dei venti da E (Grecale), cui corrisponde specularmente un picco di frequenza dei venti da O (Libeccio) durante l'inverno. In questo caso non si evidenziano particolari differenze nel regime delle velocità medie. Lungo l'asse SE-NO si verifica la stessa alternanza stagionale di frequenza tra i venti da SE (Scirocco, in estate) e da NO (Maestrale, in inverno).

Seguire le dinamiche stagionali di ricaduta dei contaminanti atmosferici lungo queste direttrici rappresenta un'opportunità notevole, soprattutto per verificare la presenza di possibili apporti differenziati, nelle deposizioni in area di studio, a partire dalla sorgente putativa e dalle fonti di emissione presenti lungo le tre direttrici, all'esterno del dominio di indagine, al di là della SS 309. Infatti, se il regime anemometrico stagionale medio degli ultimi 11 anni dovesse essere confermato



anche durante la gestione del piano di monitoraggio biologico, si potrebbero evidenziare apporti di diversa origine ad esempio fonti poste sopravvento fuori dall'area di studio.

A tale proposito si prescrive di effettuare, per ogni campagna annuale di bioaccumulo tramite trapianti lichenici, due indagini, rispettivamente nei periodi estivo ed invernale. I due periodi di esposizione dei trapianti lichenici sono stati definiti in base ad un'analisi delle medie mensili di frequenza e direzione dei venti e delle precipitazioni cumulate (Figura 16). Considerando periodi espositivi di tre mesi, per entrambe le indagini sono stati identificati i due mesi centrali estivi ed invernali (rispettivamente luglio-agosto e dicembre-gennaio), selezionando come terzo mese il meno piovoso tra giugno e settembre e tra febbraio e novembre, quindi rispettivamente giugno e febbraio (Figura 17).

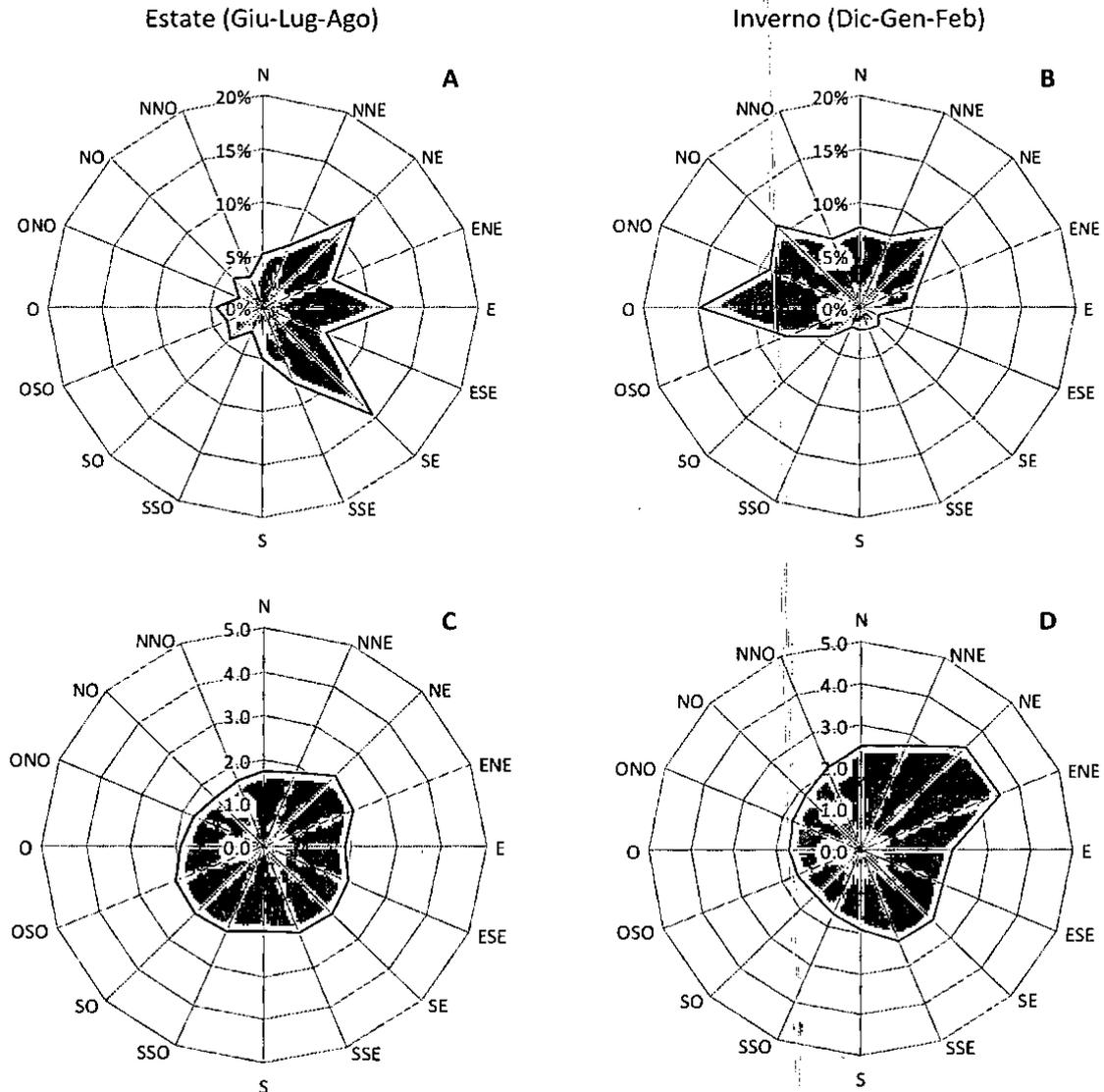


Figura 15 - Direzione, frequenza (A-B) e velocità media (C-D) dei venti misurati dalla stazione di Pradon - Porto Tolle in estate (A) ed inverno (B). Elaborazione di dati orari, periodo 1998-2008.

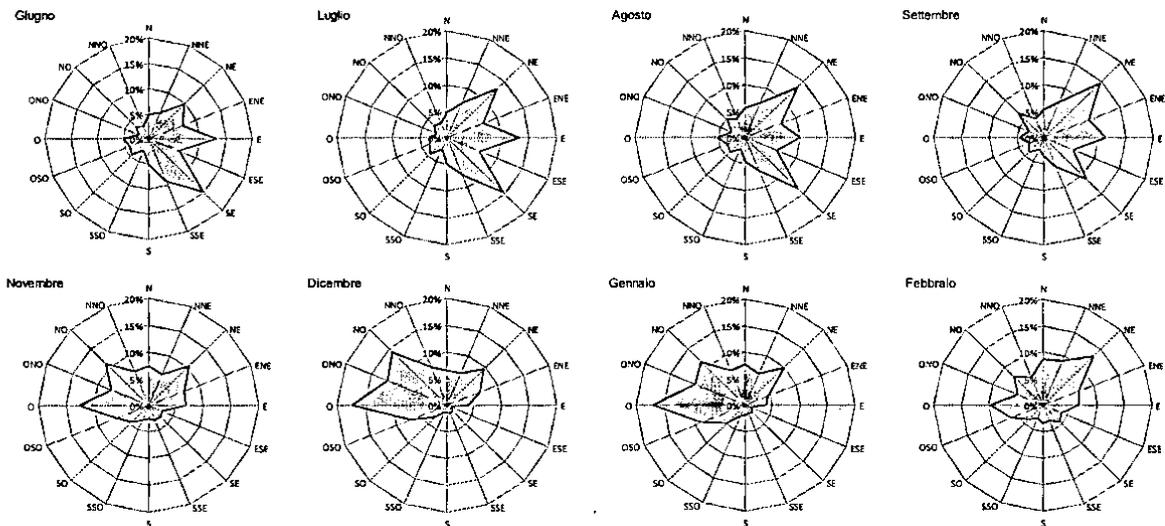


Figura 16 – Direzione e frequenza media mensile dei venti misurati dalla stazione di Pradon - Porto Tolle nei mesi estivi (in alto) ed in quelli invernali (in basso). Elaborazione di dati orari, periodo 1998-2008.

medie e dev. standard periodo 1998-2008

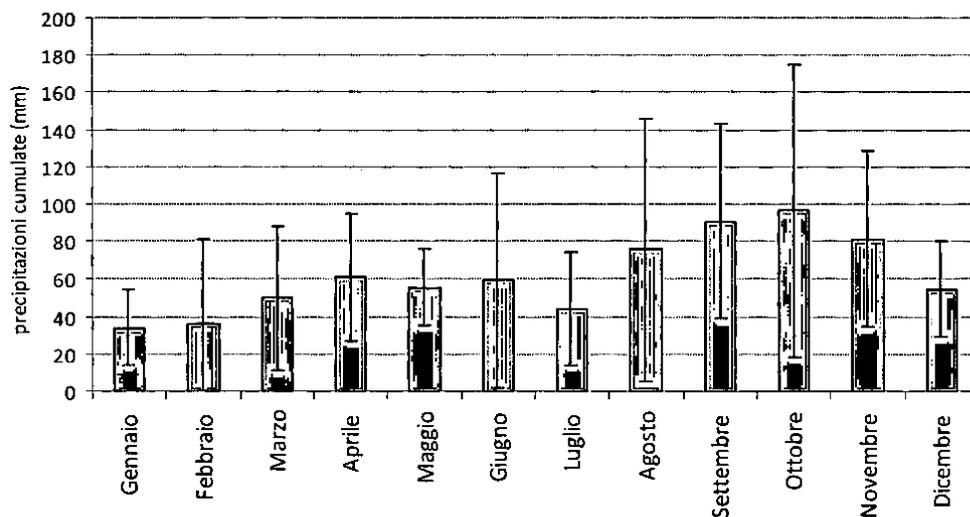


Figura 17 – Precipitazioni cumulate mensili misurate dalla stazione di Pradon - Porto Tolle. Elaborazione di dati orari, periodo 1998-2008.

In entrambe le indagini di ciascuna campagna annuale, i trapianti lichenici dovranno essere esposti in 6 Unità di Campionamento in ciascun transetto, per un totale di 18 stazioni di esposizione. La loro forma e localizzazione è stata definita in modo da realizzare un disegno sperimentale fattoriale completo, considerando direzione e distanza dalla CTE che tiene conto della modellistica diffusionale CALPUFF fornita dal Committente. La distanza delle UC dalla CTE è stata definita secondo un disegno sistematico, tenendo conto dell'estensione del dominio di indagine del biomonitoraggio (cfr. sezione 3). Poiché lungo la direttrice E-O il dominio si estende in direzione O rispetto alla CTE per circa 20 km, questa è stata considerata la massima distanza anche lungo gli altri due transetti. Questa distanza è stata suddivisa in 5 segmenti di pari lunghezza (4 km ciascuno) alla cui estremità distale, rispetto alla

CTE, sono state collocate altrettante UC. La sesta UC in ciascun transetto è stata localizzata suddividendo in due parti uguali il segmento più prossimo alla CTE, identificando la distanza minima di campionamento a 2 km da essa (Figura 18).



Figura 18 – Carta delle UC per i 3 transetti di campionamento: direttrice ESE-ONO (A1-A6), E-O (B1-B6) e NE-SO (C1-C6) (dai tipi dell'Istituto Geografico Militare, Aut. 6536 rilasciata al committente CESI in data 22/10/2009) con sovrapposizione del modello di distribuzione CALPUFF del valore medio annuo della SO_2 .

La forma delle UC è stata definita utilizzando buffer circolari, centrati sulla CTE e distanti da essa 2, 4, 8, 12, 16 e 20 km, lungo le tre direttrici principali (E-O, NE-SO e ESE-ONO). Le direttrici NE-SO e SE-NO, a causa della localizzazione di aree occupate da corpi idrici in corrispondenza di alcune delle UC, sono state ruotate rispettivamente in senso antiorario e orario, entrambe di 10° , ritenendo lo scostamento non significativo rispetto alle direzioni di provenienza dei venti principali.



Dall'intersezione delle 3 direttrici con i 6 buffer circolari, si originano i centri delle 18 UC (Tabella 11). Per ciascuna la forma è definita da un settore circolare identificato estendendo ciascun buffer di 100 m nelle due direzioni prossimale e distale rispetto alla CTE, e considerando un'ampiezza di 5° in entrambi i sensi di rotazione della direttrice del transetto (Figura 18). Ciascuna UC è quindi costituita da un settore circolare di 10° x 200 m. In questo modo le UC, a seconda della distanza dalla CTE, hanno dimensioni e area diverse, ma mantengono la rappresentatività rispetto alla direzione di provenienza dei venti, in termini di ampiezza di oscillazione in gradi.

Tabella 11 – Unità di Campionamento per l'esposizione dei trapianti lichenici.

Unità di campionamento		Direttrice	Coordinate UTM33ED50		Posizione rispetto alla CTE	
ID	Transetto		UTM Est	UTM Nord	Distanza (km)	Direzione (° da N)
1	A	ESE-ONO	300793	4982463	2	298
2	A	ESE-ONO	298590	4983635	4	298
3	A	ESE-ONO	295062	4985510	8	298
4	A	ESE-ONO	291535	4987386	12	298
5	A	ESE-ONO	288008	4989261	16	298
6	A	ESE-ONO	284481	4991137	20	298
1	B	E-O	300502	4981290	2	270
2	B	E-O	298006	4981290	4	270
3	B	E-O	294011	4981290	8	270
4	B	E-O	290016	4981290	12	270
5	B	E-O	286021	4981290	16	270
6	B	E-O	282027	4981290	20	270
1	C	NE-SO	300955	4979858	2	235
2	C	NE-SO	298910	4978426	4	235
3	C	NE-SO	295638	4976135	8	235
4	C	NE-SO	292365	4973844	12	235
5	C	NE-SO	289093	4971552	16	235
6	C	NE-SO	285820	4969261	20	235



Tabella 12 – Classi di uso del suolo selezionate per individuare i siti di esposizione dei trapianti lichenici.

Strato di campionamento	Codici	Legenda	Area ha
Foraggiere	2.1.1.1.6	Foraggiere in aree non irrigue	130
	2.1.2.1.6	Foraggiere in aree irrigue	3210
Cerealcolture (frumento)	2.1.2.2.1	Cereali in aree irrigue	3291
Zone umide o ripariali	3.1.1.6.3	Saliceti e altre formazioni riparie	360
	4.1.1.1	Canneti/giuncheti in zone umide fluviali	87
	4.1.2.1	Canneti/giuncheti in zone umide lacuali	2
	4.1.2.2	Vegetazione a dominanza arboreo-arbustiva igrofila	39
	4.2.1.4	Canneti/giuncheti in zone umide costiere	27
	2.3.2	Prati permanenti ad inerbimento spontaneo non lavorati	812

La strategia di campionamento, per l'identificazione dei siti di esposizione dei trapianti lichenici entro le UC, è di tipo stratificato, finalizzata alla collocazione dei campioni in condizioni di massima omogeneità ecologica, in assenza di fattori di disturbi locali. La selezione dei siti di esposizione è stata basata sulla seguente procedura:

- I. Definizione degli strati di campionamento, mediante inclusione delle classi di uso del suolo più omogeneamente distribuite sul territorio, e con sufficiente superficie di copertura entro le UC. Data la vocazione agricola dell'area, le classi di landcover più diffuse sono quelle appartenenti alla classe 2 del secondo livello Corine (Aree agricole, Tabella 2b). Tra queste, è fondamentale scegliere non solo in base al criterio di distribuzione e copertura entro le UC, ma anche alla tipologia culturale associata al landcover, vista la potenziale influenza delle pratiche agricole (lavorazione del terreno, trattamenti con fertilizzanti, diserbanti, irrigazione ecc.) sulle deposizioni elementari a livello locale. A partire dalla legenda Corine livello 5 della Banca Dati della Copertura del Suolo del Veneto, e dalla Carta di uso del suolo dell'Emilia-Romagna, già descritte in sede di caratterizzazione del territorio (cfr. sezione 1) sono state selezionate le classi del quinto livello Corine più diffuse. Tra queste (Tabella 2b), è stata esclusa la 2.1.2.1.1 (mais in aree irrigue, superficie complessiva 6731 ha) data la concomitanza tra il periodo di crescita e quello di esposizione estiva dei trapianti, che potrebbe influire sulla contaminazione dei campioni lichenici in seguito alle frequenti irrigazioni a pioggia di questa coltura. Sono state invece selezionate le colture ad altri cereali (3291 ha) e le foraggiere, sia in aree irrigue (3210 ha) sia non irrigue (130 ha), che, almeno considerando il frumento (tra i cereali più coltivati in area di studio), non interferiscono con i periodi di esposizione. Le due tipologie culturali differiscono ovviamente per il tipo e l'intensità dei trattamenti cui sono sottoposte, e vanno quindi considerate come due strati di campionamento distinti (Tabella 12).
- II. Al di fuori delle classi ad uso agricolo, per garantire la campionabilità di tutte le UC durante le fasi di gestione del biomonitoraggio, sono state selezionate le classi di vegetazione ripariale, che, congiuntamente, offrono un'alternativa a cerealcolture e foraggiere in termini di superficie di copertura sul territorio e distribuzione entro le UC. Sono state incluse le aree a saliceti e altre formazioni riparie (classe 3.1.1.6.3, 360 ha), la vegetazione a dominanza di canneti e giuncheti in zone umide fluviali, lacuali e costiere (4.1.1.1, 4.1.2.1 e 4.2.1.4 per complessivi 116 ha) e la vegetazione caratterizzata da dominanza arboreo-arbustiva igrofila (4.1.2.2, 39 ha). A queste sono state aggiunte le superfici a prato permanente ad inerbimento



spontaneo, non lavorate (2.3.2, 812 ha). Tutte queste aree, al di là della classificazione Corine che le distingue in base all'utilizzo, sono localizzate ai margini della fitta rete di corsi d'acqua naturali ed artificiali che caratterizza il territorio, spesso con parcelle sufficientemente ampie da consentire un'effettiva separazione dalle aree agricole, almeno in relazione ai possibili effetti di queste sui trapianti lichenici. L'accorpamento delle classi sopra citate definisce pertanto un terzo strato di campionamento, quello delle zone umide o riparali (

- III. Tabella 12).
- IV. Data la peculiarità dell'informazione sulla copertura del suolo utilizzata per la progettazione della strategia di campionamento, non è possibile stabilire a priori la localizzazione esatta dell'esposizione dei trapianti lichenici. In questa sede si prescrive in linea generale che all'interno di ciascuna UC i trapianti lichenici siano prioritariamente collocati nelle aree occupate da "foraggere" come prima scelta, nel "ripariale" come seconda e nelle aree coltivate a frumento come ultima. L'effettiva corrispondenza tra la cartografia dell'uso del suolo, risalente al 2006 per il Veneto e al 2003 per l'Emilia Romagna, e la realtà territoriale al momento dell'esposizione, dovrà essere verificata in fase di gestione del piano di biomonitoraggio.
- V. In ogni caso, oltre a criteri di omogeneità ecologica, in sede di esposizione dei trapianti si dovrà limitare il più possibile la presenza di fattori di disturbo locali, tenendo conto ad esempio dei sistemi di irrigazione, diserbo e fertilizzazione delle colture, evitando il più possibile il rischio del possibile dilavamento dei campioni, o l'apporto di elementi in traccia, causato da tali sistemi. Inoltre i trapianti dovranno essere esposti ad una distanza di almeno 30 m dalle strade trafficate più prossime.
- VI. La quantità di materiale lichenico necessario per i trapianti risulta necessariamente elevata in considerazione del numero di UC, dei campioni di controllo (v. p.to VI), delle repliche a livello locale (p.to XIII), delle stazioni aggiuntive (p.to XIV) e delle due indagini annuali. La scelta dell'organismo target non può prescindere da criteri basati sulla diffusione di popolamenti naturali a livello quantomeno nazionale, e sulla facilità del suo reperimento. La scelta deve basarsi ovviamente sull'esistenza di un adeguato e solido background scientifico, ma anche sulla facilità di trattamento pre-esposizione e sulla disponibilità di dati di confronto in contesti ambientali analoghi, da utilizzare durante la fase gestionale del monitoraggio biologico. Alcune specie di licheni fruticosi epifiti sono state frequentemente utilizzate sia in ambito scientifico (Bergamaschi et al., 2007), sia applicativo, in considerazione della notevole abbondanza dei popolamenti in aree montane, quindi facilmente accessibili e tuttavia scarsamente impattate e relativamente uniformi per condizioni ecologiche, e della praticità di utilizzo. Lo sviluppo tridimensionale del tallo consente infatti un'esposizione omogenea, non orientata secondo piani preferenziali; inoltre il naturale ancoraggio al substrato, spesso costituito da rami secondari e laterali di diametro ridotto, fornisce un supporto fisico naturale per l'esposizione, che evita l'utilizzo di bags, spesso utilizzate in studi di bioaccumulo mediante trapianti (e.g. *lichen-* o *moss-bags*, Adamo et al. 2003; Culicov e Yurukova, 2006). Tra le specie che rispondono ai suddetti requisiti si prescrive l'utilizzo di una delle seguenti due specie: *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* Zopf var. *furfuracea*. La scelta dipenderà dalla maggiore o minore facilità di reperimento del materiale. Entrambe queste due specie sono state frequentemente usate in studi di trapianti, mostrando una buona attitudine a resistere alle condizioni di post-esposizione. *Evernia prunastri* è un lichene a distribuzione circumboreale-temperato ad ampio spettro ecologico. In Italia è uno dei più comuni licheni

epifiti, dal piano basale a quello subalpino. Mostra una minore resistenza rispetto alla seconda specie, tanto da essere scomparsa da vasti settori della Pianura Padana. Sopporta condizioni di debole eutrofizzazione ambientale ed è relativamente igrofila. Questo lichene è già stato utilizzato in diversi studi di biomonitoraggio sul territorio italiano (Loppi, 2006) e per esso sono disponibili valori di riferimento per diversi luoghi di raccolta (Bargagli, 1998).



Figura 19 - La specie fruticosa *Evernia prunastri* (L.) Ach, selezionata come potenziale specie target per l'indagine di bioaccumulo di elementi in traccia tramite trapianti lichenici.

Pseudevernia furfuracea (Figura 20) è un lichene ampiamente diffuso in Europa, dalla zona boreale a quella mediterranea, dove però è ristretto alla fascia montana. In Italia questa specie è ampiamente diffusa soprattutto nella fascia montana e in quella subalpina, dove è spesso il lichene dominante su rami di conifere. Nelle regioni settentrionali italiane si può trovare anche in pianura con ridotta vitalità, specialmente in zone moderatamente inquinate, come conseguenza dell'acidificazione secondaria della scorza dei forofiti (Hale, 1968; Nimis, 1993). In Italia sono presenti due varietà che si differenziano per la diversa chimica del tallo: la var. nominale, *P. furfuracea* (L.) Zopf. var. *furfuracea*, contiene solo acido fisodico, e presenta pertanto reazione medullare negativa all'ipoclorito di sodio (C-); la var. *ceratea* (Ach.) D.Hawskw., ha acido fisodico e acido olivetorico, e presenta reazione medullare positiva rosa (C+). Le due varietà sono morfologicamente identiche, tuttavia presentano differenze distribuzionali almeno in parte imputabili a fattori climatici e geografici (Hawksworth & Chapman, 1971; Martellos, 2003). *Pseudevernia furfuracea* sopporta bene il trapianto anche su lungo periodo grazie alle sue particolari esigenze ecologiche (Tretiach et al., 2007), sebbene possa essere più sensibile della specie precedente all'apporto di sostanze eutrofizzanti. Questo lichene è già stato utilizzato in diversi studi di biomonitoraggio sul territorio italiano (Adamo et al., 2003; Basile et al., 2006; Bergamaschi et al., 2007) e per esso sono disponibili valori di riferimento per diversi luoghi di raccolta (Tretiach et al., 2007; Adamo et al., 2008).

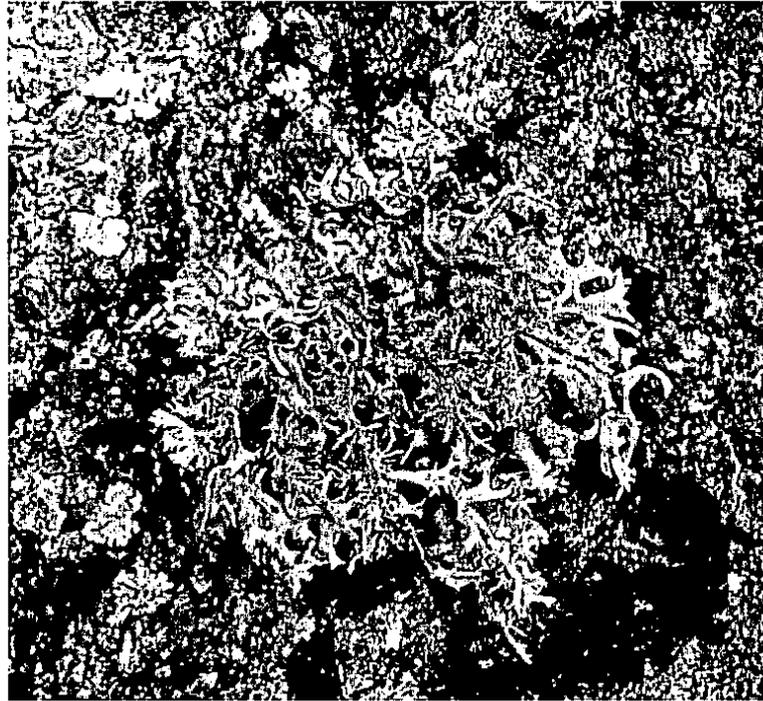


Figura 20 - La specie fruticosa *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. var. *furfuracea*, selezionata come potenziale specie target per l'indagine di bioaccumulo di elementi in traccia tramite trapianti lichenici.

- VII. Campionamento, selezione e preparazione dei campioni. La raccolta del materiale lichenico dovrà essere effettuata in siti remoti lontano da evidenti fonti di inquinamento, durante un'unica giornata prima di ciascuna campagna annuale. Sarà necessario fornire al Committente un report su modalità, data e località di raccolta, che includa informazioni derivanti da studi precedenti sui valori di contaminazione del materiale proveniente dal sito. I talli dovranno essere raccolti da rami basali di alberi appartenenti ad un'unica specie ad altezza definita ed uniforme, tagliando con un paio di cesoie un pezzo di ramo della lunghezza di c. 8-10 cm e avendo cura di non staccare il lichene dal substrato. I talli raccolti dovranno essere trasportati in laboratorio dentro scatole di cartone, dopo aver infilzato i rametti su fogli di polistirolo posti alla base delle stesse. In laboratorio si procederà alla selezione dei talli da trapiantare, eliminando quelli danneggiati, con parti necrotiche, con alghe epifite, o di dimensioni inadeguate. I campioni selezionati dovranno essere puliti, sotto microscopio binoculare, da materiale estraneo (e.g. altre specie licheniche, foglie, muschi) per poi essere appaiati e fissati con fascette autobloccanti in plastica, lavate preventivamente in acqua distillata, ottenendo così campioni doppi, ovvero ciascuno costituito da due talli (Figura 21).

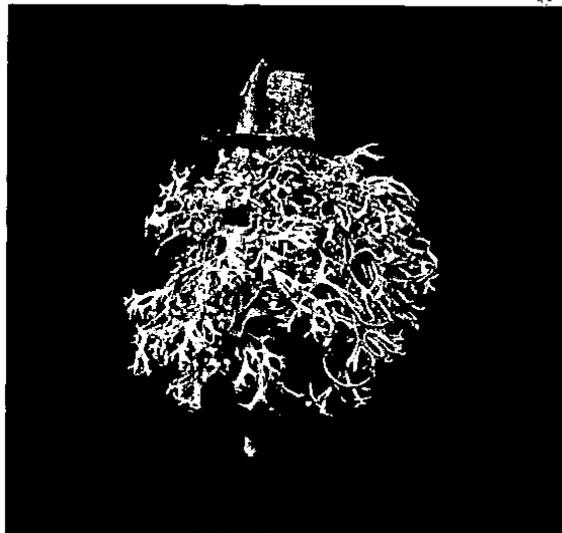


Figura 21 - Esempio di rametti appaiati

La raccolta del materiale, la sua selezione e preparazione dovranno essere effettuate utilizzando guanti in lattice non talcati lavati in acqua distillata. Al fine di rimuovere il particolato superficiale, il materiale sarà lavato in acqua distillata all'interno di un recipiente in plastica, utilizzando una quantità di acqua tale da permettere la completa immersione dei campioni (e.g. 8 litri per 50 campioni). Si prevedono quattro lavaggi sequenziali rispettivamente da 20, 15, 10 e 5 minuti, con rinnovo dell'acqua di lavaggio; il materiale va poi asciugato all'aria appendendolo a filo plastificato di modo che non venga in contatto con alcuna superficie (Figura 22).

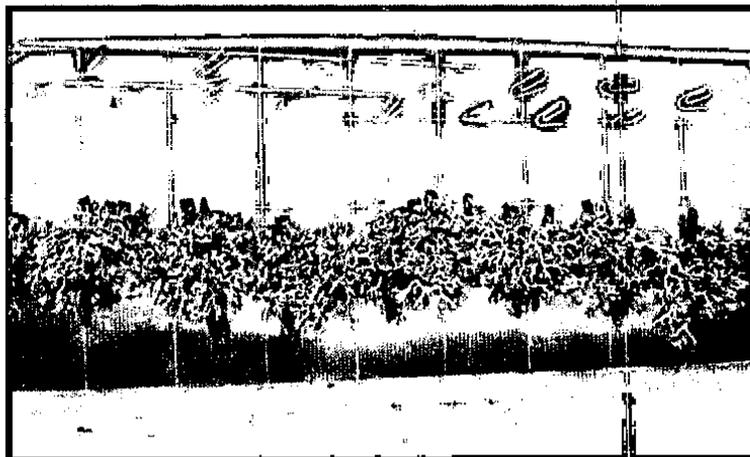


Figura 22 - Rametti appesi al filo plastificato

- VIII. Dal set di materiale lavato saranno prelevati 12 campioni doppi (v. p.to V) da sottoporre a determinazione analitica, in maniera identica ai campioni esposti (v. p.to XI), che forniranno i valori di riferimento pre-esposizione ("bianchi") per la concentrazione degli elementi in traccia, per valutare il grado di contaminazione preesistente nella matrice biologica utilizzata per il monitoraggio
- IX. Nel caso si utilizzi *P. furfuracea*, a causa della coesistenza delle due varietà chimicamente distinte, andrà eseguito il test con ipoclorito di sodio ("C") su un set di 100 lacinie prelevate casualmente dal materiale scartato in fase di pre-ripulitura (v. p.to V). Il test va effettuato



applicando una goccia di ipoclorito sulla superficie dello strato medullare della lacinia esposto con l'uso di una lametta, e osservando al microscopio binoculare l'eventuale viraggio cromatico ("C" positivo). La percentuale di test positivi per la var. *ceratea* va annotato e riportato nella scheda relativa al sito di raccolta da fornire al Committente (v. p.to V).

- X. Allestimento, esposizione e recupero. In ogni UC, nel sito ritenuto più idoneo secondo le prescrizioni di cui ai p.ti II e III, sarà collocato un apposito espositore, che dovrà: a) essere costruito con materiali che non rilasciano metalli, b) essere costituito da un supporto verticale (palo) di 4 m di altezza, c) portare in cima al palo strutture orizzontali che permettano l'esposizione di 9 campioni suddivisi in 3 gruppi di 3 campioni ciascuno senza coprirli. I campioni di ogni gruppo dovranno essere disposti: (a) ad una distanza di 15 cm l'uno dall'altro; (b) verticalmente ad una distanza dal supporto fissa e comunque sufficiente ad evitare il reciproco disturbo tra campioni (Figura 23). L'allestimento dell'espositore prevede la recinzione e la segnalazione del sito, che dovrà essere effettuato previa autorizzazione dei proprietari dei fondi. L'operazione andrà effettuata prima dell'esposizione vera e propria, avendo cura che ogni espositore non sia sottoposto a impedimenti della libera circolazione dell'aria o a effetti di percolazione (e.g. pareti di edifici, chiome d'alberi, ecc.) entro un raggio di 10 m. I campioni saranno conservati in sacchetti di plastica per alimenti per evitare possibili contaminazioni durante il trasporto, il posizionamento, e il ritiro.

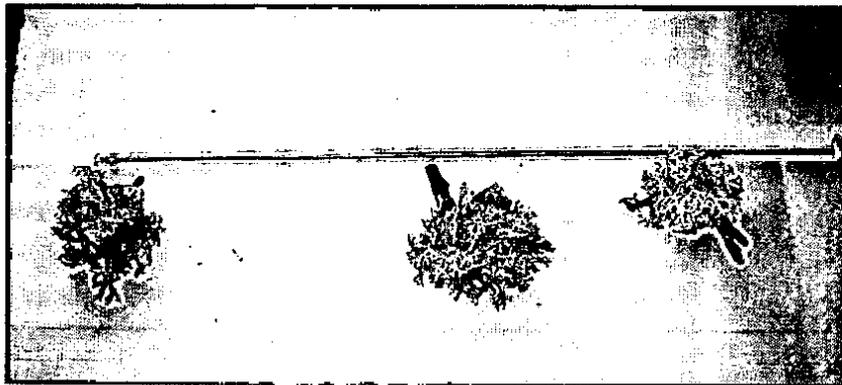


Figura 23 - Esempio indicativo di espositore con una tripletta di campioni

- XI. Ove possibile, l'esposizione dei campioni deve avvenire in tutte le UC in condizioni meteorologiche uniformi, durante un'unica giornata, o comunque in un arco di tempo il più ristretto possibile.
- XII. I prelievi del materiale vanno effettuati in tutte le UC con lo stesso ordine seguito durante l'esposizione a distanza di 3 mesi da questa, ad esempio utilizzando cesoie telescopiche con applicato un supporto, cui appendere un sacchetto aperto di plastica per alimenti. Ad ogni taglio il materiale viene raccolto direttamente dentro il sacchetto, che va immediatamente sigillato e contrassegnato. In ogni UC vanno considerati tre campioni *pooled*, ovvero tutti i talli prelevati da ciascun supporto portacampioni in ciascuna UC costituiranno un'unica matrice da sottoporre al medesimo trattamento; i tre sottocampioni di ciascuna UC dovranno essere sottoposti separatamente ai trattamenti post-esposizione, e saranno considerati repliche sperimentali. Il trattamento post-esposizione dei campioni, che include ripulitura al binoculare, essiccazione, macinazione, mineralizzazione e determinazione analitica, va effettuato in analogia a quanto prescritto per i talli lichenici autoctoni, secondo le medesime modalità riportate ai p.ti



- VII-X della sezione 4.2. In questo caso la lunghezza massima delle lacinie tagliate dai talli sarà di 2,5 cm.
- XIII. Analogamente a quanto prescritto per valutare la contaminazione terrigena nei campioni lichenici autoctoni, anche nel caso dei trapianti dovranno essere prelevati campioni di suoli superficiali in ciascuna UC, secondo le medesime procedure riportate nella sezione 4.2.
- XIV. Per verificare l'effetto dell'uso del suolo sulle dinamiche di accumulo, e per valutare la variabilità intra-stazione della contaminazione dei campioni, si prescrive un apposito studio, limitato al primo anno del presente programma di biomonitoraggio ambientale. A tal fine dovrà essere selezionata, tra le UC, quella in cui sia possibile esporre i campioni nel maggior numero di classi di uso del suolo tra quelle selezionate per gli strati (v. p.to I e
- XV. Tabella 12), ovvero quella in cui due o più classi di uso del suolo coprano la superficie maggiore rispetto a quanto osservato nelle altre UC (Figura 24). In questa UC dovranno essere collocati 3 espositori per ciascuna classe di uso del suolo selezionata, localizzati secondo uno schema di campionamento randomizzato. Mediante estrazione di una coppia di coordinate casuali UTM Est e Nord, con valori compresi entro quelli dei vertici dell'UC, sarà definito un punto interno al perimetro dell'UC ove verificare l'idoneità per l'allestimento di un espositore, secondo quanto riportato ai p.ti II e III. Tale procedura dovrà essere ripetuta iterativamente fino al raggiungimento di un numero di siti idonei all'allestimento pari al numero degli espositori richiesti. I talli esposti su ciascun espositori andranno a costituire un singolo campione *pooled*, e i campioni così costituiti, uno per ciascun espositore, andranno sottoposti separatamente al trattamento post-esposizione descritto al p.to XI.
- XVI. Per quanto riguarda la qualità delle misure, e la valutazione del rapporto tra le concentrazioni degli elementi in aria e nei campioni esposti, si prescrive l'allestimento di un numero aggiuntivo di espositori in corrispondenza alle postazioni di misura strumentale previste dal piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria. L'esposizione dei campioni aggiuntivi dovrà avvenire con le stesse modalità e tempistiche descritte ai p.ti I-XII, in concomitanza con quanto previsto per le 18 UC ordinarie. L'esatta localizzazione di questi espositori verrà decisa durante la fase di gestione del piano di monitoraggio biologico.

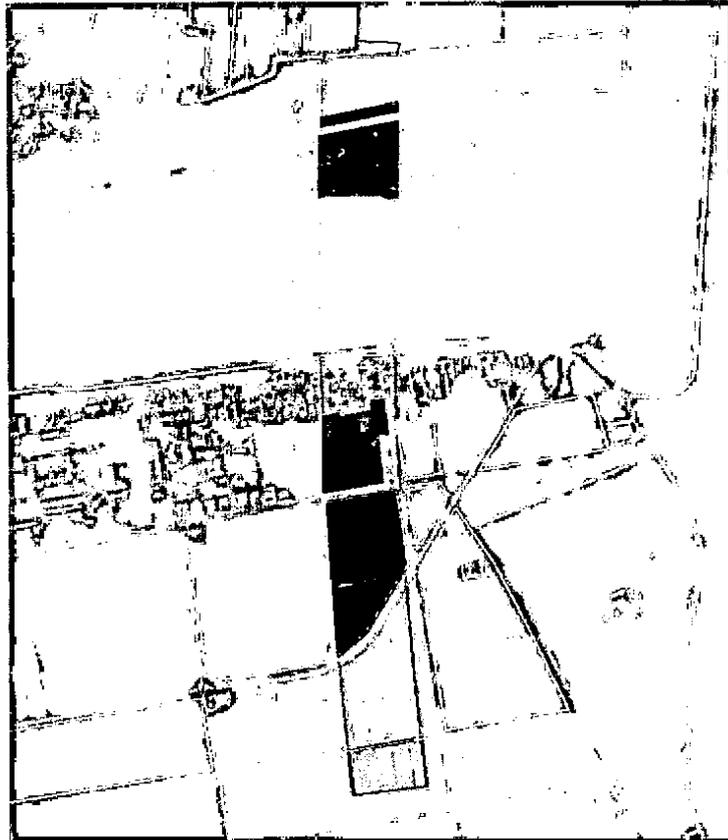


Figura 24 - Esempio ipotetico di UC per la localizzazione del sito di esposizione dei trapianti. Le aree non opacizzate appartengono ai poligoni inclusi nell'UC ove è possibile collocare gli espositori. Gli strati di esposizione sono delineati in verde scuro (zone umide o ripariali), verde chiaro (foraggere) e giallo (cerealicole).

ELABORAZIONE DEI DATI

Matrici di input

Similmente a quanto descritto per il bioaccumulo mediante licheni autoctoni, vanno preparate le seguenti matrici di input:

- UC × Elementi trapianti lichene
- UC × Variabili ambientali

Analisi della variabilità tra UC

Va applicata una ANOVA fattoriale, impostando i seguenti parametri:

Variabili dipendente: ciascuno degli elementi considerati nella matrice UC × Elementi trapianti lichene.

Variabili predittive categoriche:

- Direttrice rispetto alla CTE (3 livelli: E-O, NE-SO, ESE-ONO).
- Distanza dalla CTE (6 livelli: 2, 4, 8, 12, 16, 20 km).
- Replica (sottocampione analizzato per ciascuna UC, v. sezione 4.3)

Gli effetti devono essere considerati significativi se $p < 0,05$. Un test post-hoc va inoltre applicato per verificare la significatività ($p < 0,05$) delle differenze tra coppie di Distanza, Direttrice e delle loro interazioni. Si consiglia Tukey HSD.

Esempio, data la matrice:

	Elemento	UC	Replica	Distanza	Uso suolo	Direttrice
1	15	A1	1	2	FAB	ESE-ONO
2	21	A1	2	2	FAB	ESE-ONO
3	18	A1	3	2	FAB	ESE-ONO
4	21	A2	1	4	FAB	ESE-ONO
5	23	A2	2	4	FAB	ESE-ONO
6	25	A2	3	4	FAB	ESE-ONO
7	23	A3	1	8	FAB	ESE-ONO
8	18	A3	2	8	FAB	ESE-ONO
9	16	A3	3	8	FAB	ESE-ONO
10	25	A4	1	12	AGR	ESE-ONO
11	14	A4	2	12	AGR	ESE-ONO
12	27	A4	3	12	AGR	ESE-ONO
13	8	A5	1	16	AGR	ESE-ONO
14	6	A5	2	16	AGR	ESE-ONO
15	4	A5	3	16	AGR	ESE-ONO
16	12	A6	1	20	AGR	ESE-ONO
17	9	A6	2	20	AGR	ESE-ONO
18	15	A6	3	20	AGR	ESE-ONO
19	7	B1	1	2	AGR	E-O
20	1	B1	2	2	AGR	E-O
21	8	B1	3	2	AGR	E-O
22	13	B2	1	4	FAB	E-O
23	13	B2	2	4	FAB	E-O
24	20	B2	3	4	FAB	E-O
25	34	B3	1	8	FAB	E-O
26	32	B3	2	8	FAB	E-O
27	29	B3	3	8	FAB	E-O
28	45	B4	1	12	FAB	E-O
29	40	B4	2	12	FAB	E-O
30	57	B4	3	12	FAB	E-O
31	60	B5	1	16	AGR	E-O
32	76	B5	2	16	AGR	E-O
33	80	B5	3	16	AGR	E-O
34	35	B6	1	20	AGR	E-O
35	37	B6	2	20	AGR	E-O
36	34	B6	3	20	AGR	E-O
37	25	C1	1	2	FAB	NE-SO
38	18	C1	2	2	FAB	NE-SO
39	29	C1	3	2	FAB	NE-SO
40	49	C2	1	4	FAB	NE-SO
41	65	C2	2	4	FAB	NE-SO
42	54	C2	3	4	FAB	NE-SO
43	31	C3	1	8	AGR	NE-SO
44	27	C3	2	8	AGR	NE-SO
45	39	C3	3	8	AGR	NE-SO
46	32	C4	1	12	AGR	NE-SO
47	25	C4	2	12	AGR	NE-SO
48	31	C4	3	12	AGR	NE-SO
49	34	C5	1	16	AGR	NE-SO
50	37	C5	2	16	AGR	NE-SO
51	39	C5	3	16	AGR	NE-SO
52	30	C6	1	20	FAB	NE-SO
53	28	C6	2	20	FAB	NE-SO
54	35	C6	3	20	FAB	NE-SO



Termini del disegno

	Colonna	Variabile	Livello della var	Contro livello	Variabile	Livello della var	Contro livello	Variabile	Livello della var	Contro livello
Intercetta	1									
Replica	2	Replica	1	3						
Replica	3	Replica	2	3						
Distanza	4	Distanza	2	20						
Distanza	5	Distanza	4	20						
Distanza	6	Distanza	8	20						
Distanza	7	Distanza	12	20						
Distanza	8	Distanza	16	20						
Direttrice	9	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO						
Direttrice	10	Direttrice	E-O	NE-SO						
Distanza*Direttrice	11	Distanza	2	20	Direttrice	SE-NO	NE-SO			
Distanza*Direttrice	12	Distanza	2	20	Direttrice	E-O	NE-SO			
Distanza*Direttrice	13	Distanza	4	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO			
Distanza*Direttrice	14	Distanza	4	20	Direttrice	E-O	NE-SO			
Distanza*Direttrice	15	Distanza	8	20	Direttrice	SE-NO	NE-SO			
Distanza*Direttrice	16	Distanza	8	20	Direttrice	E-O	NE-SO			
Distanza*Direttrice	17	Distanza	12	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO			
Distanza*Direttrice	18	Distanza	12	20	Direttrice	E-O	NE-SO			
Distanza*Direttrice	19	Distanza	16	20	Direttrice	SE-NO	NE-SO			
Distanza*Direttrice	20	Distanza	16	20	Direttrice	E-O	NE-SO			
Replica*Distanza*Direttrice	21	Replica	1	3	Distanza	2	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	22	Replica	1	3	Distanza	2	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	23	Replica	1	3	Distanza	4	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	24	Replica	1	3	Distanza	4	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	25	Replica	1	3	Distanza	8	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	26	Replica	1	3	Distanza	8	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	27	Replica	1	3	Distanza	12	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	28	Replica	1	3	Distanza	12	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	29	Replica	1	3	Distanza	16	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	30	Replica	1	3	Distanza	16	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	31	Replica	2	3	Distanza	2	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	32	Replica	2	3	Distanza	2	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	33	Replica	2	3	Distanza	4	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	34	Replica	2	3	Distanza	4	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	35	Replica	2	3	Distanza	8	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	36	Replica	2	3	Distanza	8	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	37	Replica	2	3	Distanza	12	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	38	Replica	2	3	Distanza	12	20	Direttrice	E-O	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	39	Replica	2	3	Distanza	16	20	Direttrice	ESE- ONO	NE-SO
Replica*Distanza*Direttrice	40	Replica	2	3	Distanza	16	20	Direttrice	E-O	NE-SO



(Enrichment Factor – EF) è calcolato confrontando nel lichene e nel suolo il rapporto tra la concentrazione di un dato elemento e quella di un elemento estremamente abbondante nel suolo (solitamente Al o Ti), secondo la formula:

$$EF_{Al \text{ or } Ti} = \frac{\left(\frac{C_X}{C_{Al \text{ or } Ti}} \right)_{\text{in lichen}}}{\left(\frac{C_X}{C_{Al \text{ or } Ti}} \right)_{\text{in soil}}}$$

Dove C_x = la concentrazione di ogni singolo elemento x

C_{Al} = Concentrazione di Al

C_{Ti} = Concentrazione di Ti

Valori di EF >> 1 suggeriscono un contributo prevalentemente atmosferico di deposizione di un dato elemento. I valori dei fattori di arricchimento per i singoli elementi e Unità Camponarie vanno tenuti in considerazione in sede di discussione dei risultati delle analisi precedenti.

SCHEMA TEMPORALE DI ESECUZIONE

A fini del piano integrato di monitoraggio della qualità dell'aria, le indagini di biomonitoraggio mediante trapianti di licheni epifiti andranno effettuate secondo il seguente schema: due campagne annuali di esposizione nei primi due anni di attività di costruzione e cinque campagne annuali di esposizione dopo l'entrata in esercizio dell'impianto termoelettrico, di cui tre campagne annuali durante i primi tre anni di esercizio e due campagne annuali al 6° ed al 9° anno di esercizio. Le prime due campagne dovranno essere considerate quali studio pilota, teso in particolare alla determinazione dell'influenza dell'uso del suolo sulle concentrazioni misurate nei trapianti.

4. BIBLIOGRAFIA

- Adamo P., Bargagli R., Giordano S., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., Spagnuolo V., Tretiach M., 2008. Natural and pre-treatments induced variability in the chemical composition and morphology of lichens and mosses selected for active monitoring of airborne elements. *Environmental Pollution*, 152: 11-19.
- Adamo P., Crisafulli P., Giordano S., Minganti V., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., Tretiach M., Bargagli R., 2007. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part II: trace element content in living and dead biomonitors and comparison with synthetic materials. *Environmental Pollution*, 146: 392-399.
- Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobianchi R., Violante P., 2003. Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution*, 122: 91-103.
- ANPA, 2001. I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. ANPA, Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, Manuali e Linee Guida 2/2001, Roma, 85 pp.
- Bargagli R., Iosco F. P., Leonzio C., 1985. Monitoraggio di elementi in traccia mediante licheni epifiti. Osservazioni nell'area industriale di Rosignano Solvay. *Inquinamento*, 2: 33-37.
- Bargagli R., Iosco F. P., D'Amato M. L., 1987. Zonation of trace metal accumulation in three species of epiphytic lichens belonging to the genus *Parmelia*. *Cryptogamie, Bryologie et Lichénologie*, 8: 331-337.
- Bargagli R. & Mikhailova I., 2002. Accumulation of inorganic contaminants. In: P.L. Nimis, C. Scheidegger and P.A. Wolseley (Eds.), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp. 65-84.
- Bargagli R., 1998. Trace elements in terrestrial plants. An Ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer-Verlag Ed.; Berlin, Germany, 324 pp.
- Bergamaschi, L. E., Rizzio G., Giaveri V., Loppi S., Gallorini M., 2007. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted in a urban site. *Environmental Pollution*, 148: 468-476.
- Basile A., Sorbo S., Aprile G., Conte B., Cobianchi R. C., 2008. Comparison of the heavy metal bioaccumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. *Environmental Pollution*, 151: 401-407.
- Bettinelli M., Perotti M., Spezia S., Baffi C., Beone G.M., Alberici F., Bergonzi S., Bettinelli C., Cantarini P., Mascetti L., 2002. The role of analytical methods for the determination of trace elements in environmental biomonitors. *Microchemical Journal*, 73: 131-152.
- Brown D. H., 1987. The location of mineral elements in lichens; implication for metabolism. In: E. Peveling (Ed.), *Progress and problems in Lichenology in the Eighties*, *Bibliotheca Lichenologica*, 25: 361-375.
- Castello M., Cenci R. M., Gerdol R., 1998. Proposte metodologiche per l'uso di briofite come bioaccumulatori di metalli in traccia. In Piccini C., Salvati S. (Eds.): *Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*. ANPA, serie Atti 2/1999, Roma, pp 233-240.
- Castello M.; Skert N., 2005. Evaluation of lichen diversity as an indicator of environmental quality in the North Adriatic submediterranean region.. *Science of the total environment* 336: 201-214.
- Culicov O. A. & Yurukova L., 2006. Comparison of element accumulation of different moss- and lichen-bags, exposed in the city of Sofia (Bulgaria). *Journal of Atmospheric Chemistry*, 55: 1-12.
- Decreto Ministeriale del 13/09/1999. Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". *Gazz. Uff. Suppl. Ordin.* n° 248 del 21/10/1999
- Dufrene M. & Legendre P., 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67: 345-366.
- Elzinga C. L., Salzer D. W., Willoughby J. W.; Gibbs J. P., 2001. *Monitoring plant and animal populations*. Blackwell Science, Malden, MA, 360 pp.
- EPA, 1996. Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.
- EPA, 1998. Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry.
- Faith D. P., Minchin P. R., Belbin R., 1987. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio*, 69: 57-68.
- Ferretti M., Erhardt W., 2002. Key issues in designing biomonitoring programmes. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P. (Eds.): *Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 111-139.



- Garty J., 2000. Environment and elemental content of lichens. In: B. Markert, K. Friese (Eds.): Trace element – Their distribution and effects in the environment. Elsevier, Amsterdam, pp. 245-276.
- Freitas, M. C. & Nobre A. S. 1997. Bioaccumulation of heavy metals using *Parmelia sulcata* and *Parmelia caperata* for air pollution studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 217: 17-20.
- Garty J., Ammann K., 1987. The amounts of Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Fe, and Mn in some lichens growing in Switzerland. *Environmental Experimental Botany*, 27: 127-138.
- Giordani P. & Brunialti G., 2002. Anatomical and histochemical differentiation in lobes of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Mycological Progress*, 1: 131-136.
- Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H., 1985. Phytochelatin the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674-676.
- Hale M. E. Jr., 1968. A synopsis of the lichen genus *Pseudevernia*. *Bryologist*, 71: 1-11.
- Hawksworth D. L., Chapman D. S., 1971. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf and its chemical races in the British Isles. *Lichenologist*, 5: 51-58.
- ILAC G13:2000 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.
- Isaaks E. H., Srivastava R. M. (Eds.), 1989. An introduction to applied geostatistics. Oxford University Press, New York, 561 pp.
- ISO/IEC GUIDE 43-1:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 1. Development and operation of proficiency testing schemes.
- ISO/IEC GUIDE 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 2. Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
- Kruskal J. B., 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, 29: 115-129.
- Legendre P., Legendre L., 1998. Numerical Ecology. 2nd English edition. Elsevier Science BV, Amsterdam, xv + 853 pages.
- Loppi S., 2006. Licheni come bioaccumulatori di elementi in traccia: stato della ricerca in Italia. *Biologia Ambientale*, 20: 69-78.
- Lorenzini G., 1998. Piante vascolari come bioindicatori della qualità dell'aria (inquinamento da ozono): proposte metodologiche. In Piccini C., Salvati S. (Eds.): Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". ANPA, serie Atti 2/1999, Roma, pp. 199-216.
- McCune B., Mefford M. J., 1999. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4.0.. Glenden Beach, Oregon: MjM Software Design.
- McCune B., Grace J. B., Urban D. L., 2002. Analysis of ecological communities. Glenden Beach, Oregon: MjM Software Design.
- Mantel N., 1967. *Cancer Research*, 27:209-220
- Martellos S., 2003. The distribution of the two chemical varieties of the lichen *Pseudevernia furfuracea* in Italy. *Plant Biosystem*, 137: 29-34.
- Mielke P. W. Jr., 1984. Meteorological applications of permutation techniques based on distance functions. In: Krishaniah, P.R., Sen, P.K. (Eds.): Handbook of statistics, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, Vol. 4, pp. 813-830.
- Minganti V., Capelli R., Drava G., De Pellegrini R., Brunialti G., Giordani P., Modenesi P., 2003. Biomonitoring of trace metals by different species of lichens (*Parmelia*) in North-West Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 45: 219-229.
- Nimis P. L., 1993. The Lichens of Italy. Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 897 pp.
- Nieboer E. & Richardson D. H. S., 1980. The replacement of nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, 1: 3-26.
- Nimis P. L., Andreussi S., Pittao E., 2001. The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the Total Environment*, 275: 43-51.
- Nimis P. L., Bargagli R., 1998. Linee-guida per l'utilizzo di licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. In Piccini C., Salvati S. (Eds.): Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". ANPA, serie Atti 2/1999, Roma, pp. 279-287.
- Nimis P. L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N., 2000. Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *The Science of The Total Environment*, 255: 97-111.
- Nimis P. L., Martellos S., 2008. ITALIC - The Information System on Italian Lichens. Version 4.0. University of Trieste, Dept. of Biology, IN4.0/1 (<http://dbiodbs.univ.trieste.it/>).
- Nimis P. L. & Tretiach M., 1995. The lichens of Italy. A phytoclimatic outline. *Cryptogamic Botany* 5: 199-208.

- Nimis P. L., Scheidegger C., Wolseley P. (Eds.), 2002. Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 408 pp.
- Paul A., Hauck M., Fritz E., 2003. Effects of manganese on the element distribution and on the structure in thalli of the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*. *Environmental and Experimental Botany*, 50: 113-124.
- Pawlik-Skowronska B., Sanità di Toppi L., Favali M. A., Fossati F., Pirszel J., Skowronski T., 2002. Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist*, 156: 95-102.
- Pinho P., Augusto S., Martins-Loucao M. A., Pereira M. J., Soares A., Maguas C., Branquinho C., 2008. Causes of change in nitrophytic and oligotrophic lichen species in a Mediterranean climate: Impact of land cover and atmospheric pollutants. *Environmental Pollution*, 154: 380-389.
- Purvis O. W., Elix J. A., Broomhead J. A., Jones G. C., 1987. The occurrence of copper-norstictic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist*, 19: 193-203.
- Purvis O. W., Elix J. A., Gaul K. L., 1990. The occurrence of copper-psoromic acid in lichens from cupriferous substrata. *Lichenologist*, 22: 345-354.
- Quevauviller P. H., Van Renterghem D., Muntau H., Griepink B., 1992. Intercomparison to improve the quality of trace element determination in lichens. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 53: 233-242.
- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwin C., Deruelle S., Hazemann J. L., Soldo Y., Eybert-Berard L., Menthonnex J. J., 1998. Mechanism of lichen resistance to metallic pollution. *Environmental Science & Technology*, 32: 3325-3330.
- Scarselli S., Magnani T., Arosio G., Pozzoli L., 2003. Biomonitoraggio della contaminazione atmosferica nei dintorni della CTE di Porto Tolle (RO). Consulenza Tecnica, Procura della Repubblica presso il Tribunale Ordinario di Rovigo, Proc. 3577/2001 RGNG, 81 pp.
- Stofer S., Bergamini A., Aragón G., Carvalho P., Coppins B. J., Davey S., Dietrich M., Farkas E., Kärkkäinen K., Keller C., Lökös L., Lommi S., Maguas C., Mitchell R., Pinho P., Rico V. J., Truscott A. M., Wolsley P. A., Watt A., Scheidegger C., 2006. Specie richness of lichen functional groups in relation to land use intensity. *Lichenologist*, 38: 351-353.
- Tretiach M., Baruffo L., 2001. Deposizione di metalli nella Pedemontana Pordenonese. Uno studio basato sui licheni come bioaccumulatori. Provincia di Pordenone, Pordenone, 64 pp.
- Tretiach M., Pittao E., 2008. Biomonitoraggio di metalli mediante licheni in cinque aree campione della provincia di Pordenone. Stato attuale e confronto con i dati del 1999. Provincia di Pordenone, Pordenone, 77 pp.
- Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., Giordano S., Modenesi P., Orlando S., Pittao E., 2007a. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I. Influence of exposure on sample vitality. *Environmental Pollution*, 146: 380-391.
- Tretiach M., Nimis P. L., Hafellner J., 2008. Miscellaneous records of lichens and lichenicolous fungi from the Apuan Alps and the Tuscan-Emilian Apennines (central Italy). *Herzogia* 21: 93-103.
- Tretiach M., Piccotto M., Baruffo L., 2007b. Effects of ambient NOx on chlorophyll a fluorescence in transplanted *Flavoparmelia caperata* (Lichen). *Environmental Science & Technology*, 41: 2978-2984.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
- VDI-Richtlinie 3799, Blatt 1 (1995). Ermittlung und Beurteilung phytotoxischer Wirkungen von Immissionen mit Flechten: Flechtenkartierung. – VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Bd. 1, Beuth-Verlag, Berlin.
- Verein Deutscher Ingenieure (VDI), 2005. Biological measurement procedures for determining and evaluating the effects of ambient air pollution by means of lichens (bioindication). Mapping the diversity of epiphytic lichens as an indicator of air quality. VDI-Richtlinien, VDI 3957 Blatt 13, Beuth-Verlag, Berlin, 28 pp.