

ROSELECTRA S.p.A.

**Biomonitoraggio Integrato e Avanzato
per lo studio delle ricadute saline
derivanti dal drift delle torri evaporative
nel territorio di Rosignano Solvay**

Relazione tecnico-scientifica
Biomonitoraggio attivo

ALLEGATI



ROSELECTRA S.p.A.

**Biomonitoraggio Integrato e Avanzato
per lo studio delle ricadute saline
derivanti dal drift delle torri evaporative
nel territorio di Rosignano Solvay**

Relazione tecnico-scientifica
Biomonitoraggio attivo

Allegato 1: Sistema di qualità



1. Oggetto.
2. Realizzazione e Gestione della Rete di Biomonitoraggio.

1 – Oggetto

Il presente documento, con riferimento al “Manuale del Sistema di Qualità” della Società Strategie Ambientali S.r.l., tratta delle disposizioni relative alla “Biomonitoraggio Integrato e Avanzato per lo studio delle ricadute saline derivanti dal drift delle torri evaporative nel territorio di Rosignano Solvay” Contratto di Servizio Contratto n° 0079/06/PD del 05.04.2006.

Il “Manuale del Sistema di Qualità” prevede, infatti, che, nella fase di gestione della Rete, il “Responsabile del Controllo di Qualità” verifichi che tutte le attività svolte siano state eseguite secondo le relative ed apposite disposizioni e norme. Per le disposizioni qui applicabili si rimanda, in particolare, alla “Specifica Tecnica” e al “Progetto esecutivo” elaborato e sviluppato da Strategie Ambientali nella fase preliminare dello studio. Inoltre, per la cronologia dei lavori, si fa riferimento al cronoprogramma e al diagramma di GANNT, proposto dalla Società Strategie Ambientali S.r.l. ed approvata dalla Committenza.

2 - Realizzazione e Gestione della Rete di Monitoraggio Biologico

Al termine di questo periodo di gestione (anno 2007) relativo alla terza fase di gestione della Rete di Biomonitoraggio, il Responsabile del Controllo di Qualità ha (secondo quanto disposto dal Manuale del Sistema di Qualità) verificato:

- la tipologia e la quantità di biosensori utilizzati;
- la metodologia seguita per il campionamento dei biosensori passivi;
- la metodologia seguita per il campionamento dei biosensori attivi;
- la metodologia seguita per la conservazione e la preparazione dei campioni;
- le unità di misura e la tipologia di elementi chimici ricercati;
- le metodologie per la mineralizzazione;
- le metodologie utilizzate per le analisi chimiche;
- le metodologie utilizzate per le analisi statistiche;

- le metodologie per l'elaborazione e l'interpretazione dei dati;
- le procedure per la redazione della cartografia tematica;
- la tempistica.

secondo le indicazioni e le procedure contenute nella documentazione suddetta.

ROSELECTRA S.p.A.

**Biomonitoraggio Integrato e Avanzato
per lo studio delle ricadute saline
derivanti dal drift delle torri evaporative
nel territorio di Rosignano Solvay**

Relazione tecnico-scientifica
Biomonitoraggio attivo

**Allegato 2: Rapporto sul Controllo di Qualità della
gestione della Rete**



Indice

- | | |
|--|--------|
| 1) Oggetto | Pag. 3 |
| 2) Disposizioni | Pag. 3 |
| 3) Disposizioni sul Controllo di Qualità | Pag. 4 |

1 - Oggetto

Il presente documento, con riferimento al “Manuale del Sistema Qualità” della Ditta Strategie Ambientali S.r.l., tratta delle disposizioni relative alle attività del secondo anno di gestione della “Biomonitoraggio Integrato e Avanzato per lo studio delle ricadute saline derivanti dal drift delle torri evaporative nel territorio di Rosignano Solvay” Contratto di Servizio Contratto n° 0079/06/PD del 05.04.2006.

Le disposizioni sul controllo di qualità della gestione della rete prevedono che, nell'anno di gestione, il responsabile del “Controllo di Qualità” verifichi che tutte le attività svolte siano state eseguite secondo le relative ed apposite disposizioni e norme, indicate nella “**Specifica Tecnica**” e nel “**Progetto esecutivo**” elaborato e sviluppato da Strategie Ambientali s.r.l., nella relazione della fase di “Progettazione e installazione della Rete di Biomonitoraggio”.

2 - Disposizioni

Per le disposizioni qui applicabili vedi:

- Sistema di qualità;
- Proposta tecnica Per una “Biomonitoraggio Integrato e Avanzato per lo studio delle ricadute saline derivanti dal drift delle torri evaporative nel territorio di Rosignano Solvay” Contratto di Servizio Contratto n° 0079/06/PD del 05.04.2006.
- Il documento 1 - *Modello per lo studio della “diffusione atmosferica degli inquinanti”*;
- Il documento 3 - *Progetto esecutivo per la “Ricerca del Punto Zero”*;

- Le Norme VDI n. 3792 foglio 1 – 2;
- Le Norme VDI n. 3792 foglio 5;
- Il Manuale e Linee guida per la Rilevazione dell'Indice di Biodiversità Lichenica (ANPA 2001)
- Le linee guida BARGAGLI/NIMIS;
- Le linee guida ANPA per l'applicazione della metodica di biomonitoraggio attivo mediante la tecnica "dei Moss-bags";

3 – Disposizioni sul Controllo di Qualità

Al termine dell'anno di gestione il Responsabile del Controllo di Qualità ha verificato quanto di seguito elencato, secondo le disposizioni del Manuale del Sistema di Qualità, e, quindi, sulla base della Specifica Tecnica e del Progetto Esecutivo

Elenco verifiche:

- verifica della tipologia e della quantità di biosensori campionati;
- verifica della tipologia e della quantità di sensori campionati;
- verifica della metodologia seguita per il campionamento dei biosensori;
- Verifica della metodologia per il reperimento, la raccolta e la preparazione dei campioni per il biomonitoraggio attivo.
- verifica della metodologia seguita per la valutazione del danno foliare;
- verifica della strumentazione e del supporto tecnico utilizzati per le attività di campo;
- Verifica della taratura della strumentazione;
- verifica della metodologia seguita per la conservazione e la preparazione dei campioni;
- verifica della quantità e della tipologia di elementi chimici ricercati;
- verifica delle metodologie utilizzate per le analisi chimiche;
- verifica del trattamento dati;

- verifica delle metodologie utilizzate per le analisi statistiche e geostatistiche;
- verifica dell'immissione dei dati nel PC;
- verifica della struttura dei database georeferenziati e delle metodiche per la progettazione del Sistema Informativo Territoriale a supporto dello studio;
- verifica della tempistica;

secondo le indicazioni e le procedure contenute nella Specifica Tecnica, e nel Progetto Esecutivo.

ROSELECTRA S.p.A.

**Biomonitoraggio Integrato e Avanzato
per lo studio delle ricadute saline
derivanti dal drift delle torri evaporative
nel territorio di Rosignano Solvay**

Relazione tecnico-scientifica
Biomonitoraggio attivo

Allegato 3: VDI 3792 fogli 1, 2, 5



Nelle pagine che seguono si riporta la traduzione dei documenti in lingua tedesca recanti le metodologie di monitoraggio adottate dall'Associazione Tedesca degli Ingegneri (VDI) e seguite per il presente progetto:

- **MONITORAGGIO DELLE DOSI ATTIVE**
Metodo delle colture erbacee standardizzate
VDI 3792 - Foglio 1 - Luglio 1978..... pag. 2

- **MONITORAGGIO DELLE QUANTITA' ATTIVE DELLE IMMISSIONI**
Monitoraggio delle quantità reattive delle immissioni di fluoruro sotto
forma di gas e di polvere nelle piante, con il metodo della coltura
standardizzata
VDI 3792 - Foglio 2 - Gennaio 1982..... pag. 8

- Metodo di misurazione della quantità attiva d'immissione nelle
foglie e negli aghi degli alberi nella loro ubicazione naturale
VDI 3792 - Foglio 5 - Giugno 1991..... pag. 14

VDI-ASSOCIAZIONE TEDESCA DEGLI INGEGNERI

MONITORAGGIO DELLE DOSI ATTIVE.

Metodo delle colture erbacee standardizzate

VDI 3792 - Foglio 1 / Luglio 1978

Questa Direttiva è stata sottoposta, con notifica alla Gazzetta Ufficiale (Federale), ad un aperto procedimento di opposizione.

INDICE

Premessa

1. Presupposti metodologici

1.1 Attrezzatura per l'esposizione

1.2 Metodologia per la coltura delle piante

2. Realizzazione tecnica

2.1 Coltivazione delle colture

2.2 Sistemazione dei contenitori

2.3 Esposizione e intervallo nella misurazione

2.4 Campionatura

2.5 Utilizzo dei campioni

Bibliografia

Commissione dell'Associazione Tedesca degli Ingegneri (VDI) per la conservazione dell'aria

Commissione per l'attuazione dei procedimenti di rilevamento e monitoraggio.

Manuale per la conservazione dell'aria della VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri, Volume 1.Registro Nr 2.

Premessa

Il monitoraggio sugli effetti dell'inquinamento atmosferico sulle piante, secondo i principi del metodo di rilevamento chimico-fisico, è stato incluso recentemente nelle ricerche nell'ambito della tutela dell'aria. Per l'analisi dell'incremento delle sostanze nocive in oggetti scelti dal mondo vegetale superiore e inferiore, sono stati formulati dei procedimenti di misurazione, che rappresentano un risultato di notevole efficacia, nel senso più ampio del termine. L'aumento nelle piante di sostanze provenienti dall'aria inquinata ci trasmette, attraverso i componenti dell'immissione, una prima idea sulla quantità e sul tipo del carico inquinante, cui è sottoposto il gruppo in oggetto, e di conseguenza il relativo potenziale di pericolo. In secondo luogo ci facilita la valutazione di una minaccia di intossicazione, nella catena alimentare, di uomini e animali, attraverso la contaminazione accertata da parte di componenti rilevanti da un punto di vista tossicologico. Terzo, dall'incremento delle sostanze nocive rilevate, risulta anche l'importanza della vegetazione per la filtrazione di sostanze nocive dall'atmosfera (effetto di abbassamento/diminuzione).

La validità del procedimento di monitoraggio biologico è, analogamente al metodo chimico-fisico, nella adeguatariproducibilità dei valori di misurazione. Ne consegue che, per la rilevazione dell'incremento di sostanze nocive nelle piante, viene così ridotta al minimo la dispersione dei valori causata da fattori endogeni ed esogeni, attraverso l'avvantaggiarsi di condizioni marginali. Il metodo illustrato nella Direttiva risponde

ampiamente a questa esigenza, in quanto vengono così unificati tutti i fattori che influiscono sull'incremento di sostanze in generale e in particolare sui componenti delle immissioni (esclusi i fattori climatici). Nel metodo qui descritto le colture verranno esposte per 14 giorni e gettate via dopo la campionatura.

1. PRESUPPOSTI METODOLOGICI

Per la normalizzazione di quei fattori che possono influire sulla assimilazione e quindi sull'incremento di sostanze nocive nelle foglie delle piante, dovremo stabilire delle particolari premesse di carattere tecnico-metodologico riguardanti sia la messa a punto della esposizione, che il metodo di coltura delle piante (cfr Bibliografia 1).

1.1 Attrezzatura per l'esposizione (*)

Per l'esposizione della coltura alternata verrà utilizzato il contenitore raffigurato nella figura 1 (vv appendice) (cfr Bibliografia 2), che è composto da due elementi di base, dal contenitore vero e proprio (4), costituito da due camere, e dal rivestimento esterno (1) che funge da supporto del contenitore stesso.

Il contenitore è costruito con materiale sintetico. E' diviso in due camere da un disco forato rimovibile (6), che poggia su un anello di sostegno (5). Nella camera inferiore possono essere collocati, per l'approvvigionamento delle colture, circa 3.000 ml di acqua. La camera superiore ha un volume di 1.000 ml e accoglie sia il substrato vegetativo che il cilindro in ceramica per l'impianto di irrigazione spontanea (cfr Bibliografia 3). Al di sotto del bordo del contenitore sono collocati due fori prospicienti (9), cui viene assicurato un filo di nylon, che serve da maniglia. Il foro (8), al di sotto dell'anello di sostegno (5), serve da sfioratore; previene, nel caso di forti precipitazioni atmosferiche, il ristagno dell'acqua nel substrato vegetativo. In caso di necessità, in genere dopo la metà del tempo di esposizione, attraverso questo foro si può anche aggiungere acqua alla riserva idrica. Sul contenitore si trova il cosiddetto anello di raccordo (7), che rende possibile la centratura del vaso nel contenitore portante. Inoltre, sempre attraverso l'anello di raccordo, viene diminuita la superficie utile del contenitore stesso. Attraverso questa diminuzione otteniamo un rapporto ottimale fra il fabbisogno d'acqua delle colture e la riserva idrica stessa.

Il rivestimento esterno (1 / figura 1) è costruito in materiale sintetico ed è esternamente dipinto di bianco. La tinta chiara provoca una maggiore riflessione dei raggi solari e impedisce in questo modo degli indesiderati aumenti di temperatura nel substrato di terra. Il rivestimento esterno (contenitore portante) viene avvitato, grazie al dado (2) saldato sul suo fondo, ad un tubo di ferro zincato (10), che ha una estremità a punta piena. Questo tubo corrisponde al montante, che trova uso nell'impianto di misurazione delle polveri secondo Bergerhoff (cfr Bibliografia 4)**. L'altezza dell' esposizione dal terreno ammonta a 150 cm, misurata fino all'angolo superiore del rivestimento esterno.

Il cilindro in ceramica, che troviamo rappresentato nella figura 2 (vedi appendice), ha una lunghezza di 60 mm e un diametro di 32/18 mm. Sulla estremità aperta del cilindro è fissata una calotta in materiale sintetico, al centro della quale si trova un foro di 10 mm. Il tubo di aspirazione, costruito in caucciù silconico resistente a pressoflessione, ha un diametro di 4/2 mm e una lunghezza di 350 mm. E' inserito ermeticamente in un tappo di gomma conico e cavo, 9 : 13 mm di diametro e 20 mm di altezza. Con l'aiuto di questo tappo il tubo di aspirazione viene ermeticamente collegato al cilindro. Per rendere possibile il collegamento idrostatico fra il cilindro in ceramica e la riserva idrica, inseriremo, attraverso uno dei fori del disco (6 della figura 1), l'altra estremità del tubo nella camera della riserva stessa.

NOTE:

*L'apparecchio per l'esposizione si può acquistare dalla ditta Wilhelm Ritter Kg, Postfach 7 02 35 (casella postale), 4630 Bochum, Germania.

**Il montante si può acquistare dalla ditta Rudolf Kühnemund KG, 6521 Hamm / Rhld., Germania.

1.2 Metodologia della coltura delle piante

Alle piante che verranno coltivate, dovremo assicurare di volta in volta condizioni omogenee.

Queste le premesse metodologiche :

- Utilizzo esclusivo di sementi di prima qualità;
- Standardizzazione della tecnica di semina e raccolta;
- Standardizzazione di tutte le ulteriori disposizioni, ad esempio dell'approvvigionamento idrico e delle sostanze nutritive delle piante.

1.2.1 Selezione dei sementi

Dagli esperimenti eseguiti fra il 1967 e il 1970 su varie erbacee "da pascolo", è stata stabilita la superiorità del *Lolium multiflorum* LAM ssp, grazie al suo rapido sviluppo e crescita, alla elevata resistenza alla campionatura, all'ottimo potenziale rigenerativo nonché grazie all'assenza di un periodo di riposo. Per questo motivo il *Lolium* verrà utilizzato come monocoltura in questo procedimento di monitoraggio. Fra i diversi tipi è stato scelto quello "Lema" (Consigliere di controllo delle varietà della Società Tedesca di Agricoltura). I sementi del livello "Elite" possono essere acquistati direttamente dal coltivatore (Norddeutsche Pflanzenzucht Hans Georg Lembke KG, Post Holtsee ü.b. Eckenförde, 2331 Hohenlieth, Germania).

Il calcolo della quantità di semente necessaria dipende dal valore d'uso G , che si ottiene dalla seguente formula: $G = R \cdot K / 100$

tenendo presente che con R intendiamo la purezza e con K il potenziale germinativo.

Un valore d'uso di almeno 90 ci dà, per la coltura alternata, una quantità di semente di circa $30\text{g/mq} = 0,3\text{ g/ contenitore}$. In caso di valore d'uso minore, va calcolata una adeguata maggiorazione.

1.2.2. TECNICHE DI SEMINA E DI RACCOLTA.

La coltivazione deve avvenire preferibilmente in una serra, o altrimenti in piccole serre interrate (primizie). Le colture vengono seminate dapprima in semplici ciotole di argilla non vetrose (sottovasi del tipo comunemente in commercio per i vasi di fiori) del diametro di 12 cm, altezza di 3 cm. I sottovasi vanno sistemati in vasche di materiale sintetico riempite di torba umida, a loro volta sistemate nella serra. Le misure delle vasche utilizzate sono : 40 cm / 60 cm / 12 cm sufficienti per 10-12 vassoi. Nel periodo che va dalla semina all'inizio delle colture i vassoi devono essere sistemati sotto campane in plastica smontabili (ad esempio quelle della ditta Duser, di Neuwied), che assicurano l'elevata umidità dell'aria necessaria per la germinazione. Sotto una cupola di questo tipo (dimensioni 130cm * 105cm) si possono collocare 4 vasche in materiale sintetico delle suddette dimensioni.

1.2.3. SUBSTRATO VEGETATIVO E SOSTANZE NUTRITIVE

Sia per la coltivazione che per l'esposizione delle colture viene utilizzato come substrato vegetativo la terra comunemente in commercio secondo *Fruhstorfer*, del tipo 0 (cfr bibl. 5), che da ora in poi chiameremo semplicemente terra. Ricordiamo che questo tipo di terra, alcuni giorni prima dell'utilizzo, deve essere omogeneamente umidificata con abbondante acqua deionizzata (il contenuto di acqua ammonta a circa il 50%).

2. REALIZZAZIONE TECNICA.

2.1. LA COLTIVAZIONE DELLE COLTURE.

La terra, per la preparazione della semina, deve essere umida e sbriciolata (contenuto d'acqua di circa il 50%), e sistemata sofficemente sui vassoi. La superficie dei bordi deve essere liscia, livellata e ben pressata con l'ausilio di un disco adeguato, di legno o in materiale sintetico. I semi pesati, da 0,3 gr, verranno distribuiti uniformemente sulla superficie e ricoperti, quindi, da uno strato sottile di terra, appena appena pressato. I vassoi verranno quindi delicatamente spruzzati di acqua deionizzata. La condizione necessaria per una germinazione omogenea dei semi e per una rigogliosa crescita delle colture è rappresentata, in primo luogo, da un ottimale rifornimento idrico delle colture (acqua deionizzata). Per questo motivo i sottovasi di argilla vengono collocati, dopo la semina, nelle vasche in materiale sintetico riempite di terra ben inumidita.

Questa terra dovrà essere arricchita di sostanze nutritive e precisamente :

A 1 Kg di terra con un contenuto idrico di circa il 50% verrà aggiunto 0,6 l di soluzione nutritiva. Questa soluzione prodotta con acqua deionizzata contiene in 1000 ml

5,8 gr KH_2PO_4

8,5 gr KNO_3

5,3gr NH_4NO_3 .

La superficie dei vassoi deve essere preservata dall'aridità attraverso ripetute innaffiature. Subito dopo la semina si consiglia di coprire le vasche con le serre mobili in plastica (cupole), se possibile nella serra stessa, altrimenti all'aperto. Nei contenitori chiusi l'umidità dell'aria si mantiene omogenea, impedendo così alla terra di seccarsi. E' però necessario assicurarsi che i contenitori siano in ombra, quando il tempo è soleggiato e le temperature molto elevate,. Se il tempo è buono le piante nascono già dopo 4-5 giorni; in presenza di temperature più basse, dopo circa 7-8 giorni. Nella stagione fredda il lasso di tempo che separa la semina dallo spuntare delle piantine, in serre non riscaldate, si può allungare a 14 giorni. Immediatamente dopo lo spuntare delle piante le vasche devono essere prelevate dalle piccole serre interrate (primizie) e sistemate nella serra (magazzino) per irrobustire le piante. Coloro che non dispongono di una serra dovranno assicurarsi che le piante siano ben arieggiate . Dopo essere spuntate le piante giovani necessitano regolarmente di acqua deionizzata.

Durante l'innaffiatura si dovrà fare attenzione a non smuovere dalla terra le piantine appena germogliate. Non appena le piante raggiungono gli 8-10 cm di altezza, (dopo circa 8 giorni dopo essere spuntate), devono essere tagliate, riportate cioè a 4 cm di altezza.

Nel corso della successiva coltura le piante dovranno essere ripetutamente svettate, a distanza di 8-10 giorni,se necessario. Nella crescita successiva le piante avvilluppano così strettamente la terra, con le radici, da formare un pane compatto. In questa fase si procederà alla irrigazione nel seguente modo:

Si estrae il pane dal vassoio, lo riempiamo d'acqua, dopodichè vi ricollochiamo la pianta. In questo modo eviteremo che la superficie si indurisca a mo' di crosta. Per fornire alle colture un ottimale apporto di sostanze nutritive, a partire dal 14esimo giorno dallo spuntare della pianta si verserà nei vassoi la soluzione già menzionata nel paragrafo 2.1., e dopo 10 giorni si ripeterà l'operazione.

Ogni vassoio (cfr paragrafo 1.2.2) contiene 40 ml della su indicata soluzione, che può essere versata direttamente sulla terra umida con una pipetta o un cilindro graduato. Ma poichè nei giorni torridi la soluzione nutritiva, salina, può provocare danni di acidità alle piante, si consiglia di seguire questo metodo :

dopo aver annaffiato con acqua deionizzata si solleva un po' dal recipiente il pane di terra della pianta, vi si versa la soluzione fertilizzante e si risistema con cautela il pane.

Per temprare le colture è necessario assicurare nella serra un ottimale ricambio dell'aria. Dopo circa 3 giorni dalla somministrazione del concime azotato, si sistemano le colture all'aperto e 4 giorni prima dell'esposizione nella zona da studiare si trapiantano nei contenitori. Per assicurare alle colture una esposizione nei tempi giusti, vanno seguiti degli intervalli di tempo ben precisi. La durata della coltivazione richiede in media 6 settimane, nel periodo che va da maggio ad agosto. Prima e dopo questo tempo la durata si prolungherà di circa 1 o 2 settimane. I tempi suindicati vanno considerati tempi minimi e si riferiscono a colture erbacee forti e resistenti. Il pane con le radici si estrae senza fatica dai sottovasi e si trapianta nel contenitore.

2.2 SISTEMAZIONE DEI CONTENITORI

Riempiamo innanzitutto il contenitore con acqua deionizzata fino al foro dello sfioratore e sistemiamo il disco forato, che verrà coperto da un filtro rotondo e umido, del diametro di 9 cm, per impedire che la riserva d'acqua si sporchi con particelle di terra. Attraverso uno dei fori a margine del disco inseriamo il tubo di aspirazione nella camera contenente la provvista idrica. Vi sistemiamo quindi il cilindro in ceramica, riempito di acqua deionizzata con uno spruzzatore, e inseriamo il tubo di aspirazione a tenuta stagna, completamente privo di bolle d'aria.

Sotto il cilindro in ceramica sistemiamo uno strato di terra di circa 1 cm. Il cilindro verrà collocato perfettamente orizzontale e ben premuto. Infine il tubo di aspirazione spinto il più giù possibile nella camera contenente la riserva d'acqua. Adesso aggiungiamo altra terra fino a circa 3 cm dal bordo del contenitore e per evitare vuoti, premiamo bene, soprattutto intorno al cilindro di ceramica. Infine versiamo sulla terra 40 ml di soluzione per contenitore e sistemiamo l'anello di riduzione sul vaso. Lo spazio vuoto sotto l'anello verrà riempito di terra. Ora estraiamo la coltura dal vassoio, la sistemiamo sopra il contenitore e con i polpastrelli premiamo bene, anche fra le singole piantine (vedi figura 3), in modo da ottenere una giusta compattezza del terreno. Rimuoviamo l'anello di riduzione e innaffiamo dall'alto la coltura.

2.3 ESPOSIZIONE E INTERVALLO NELLA MISURAZIONE

Dapprima inseriamo la colonna nel terreno, in modo da ottenere una porzione esposta di circa 150 cm (calcolati dall'angolo superiore del contenitore stesso) e poi avvitiamo il rivestimento esterno, che funge da vaso portante. Per la messa a punto dell'esposizione, in laboratorio si riempirà la riserva idrica del contenitore, con uno spruzzatore, fino a raggiungere lo sfioratore. Taglieremo quindi la ricrescita dell'erba di tutti i contenitori a circa 4 cm dalla base e somministreremo altri 40 ml di soluzione.

Per il trasporto chiuderemo i fori ai lati del contenitore e lo sistemeremo in un furgone chiuso, per una migliore protezione delle colture. Nel luogo di esposizione distanzieremo il tappo dallo sfioratore, riempiamo di nuovo la riserva idrica (con acqua deionizzata) e collocheremo, con molta cautela, il contenitore delle piante nel rivestimento esterno. Adesso inseriamo il filo di nylon nello spazio fra le due pareti del contenitore e rimettiamo l'anello di riduzione. Fare attenzione che nessuna pianta vi rimanga attaccata. Con un tempo caldo e secco si consiglia una dose di acqua di circa 250 ml.

Per la sostituzione dei contenitori delle colture alla fine dell'intervallo di misurazione (14 ± 1 giorni), rimuoveremo dapprima l'anello di riduzione, poi la corda di nylon che abbiamo utilizzato come maniglia e infine sfileremo il contenitore dal rivestimento esterno. Per i nuovi contenitori ripeteremo tutte le fasi del procedimento qui descritto.

2.4 LA CAMPIONATURA

Il campione va prelevato secondo la Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 3792 pagina 2. Dopo questa operazione, i contenitori devono essere svuotati e puliti.

2.5. UTILIZZO DEI CAMPIONI

Se nel progetto è prevista l'analisi di piante sia lavate che non, dovremo suddividere quindi il materiale secondo il taglio e utilizzarlo sulla base della Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 3792 foglio 2.

APPENDICE

Figura 1: Impianto per l'esposizione della coltura

- 1 Rivestimento esterno /supporto
- 2 Dado
- 3 Sfiatatoio/apertura per il deflusso
- 4 Contenitore per la coltura delle piante
- 5 Anello di sostegno
- 6 Disco forato
- 7 anello di riduzione/di raccordo
- 8 Sfiatore
- 9 Foro per l'impugnatura
- 10 Tubo di ferro

Parte superiore del disegno : spazio per il substrato vegetale;

Parte inferiore: spazio per la riserva idrica.

Figura 2: Cilindro in ceramica per l'approvvigionamento idrico spontaneo.

- 1 Cilindro in ceramica
- 2 Calotta in materiale sintetico
- 3 Tappo di gomma
- 4 Tubo di aspirazione

Figura 3: Contenitore per la coltura delle piante dotato di cilindro in ceramica.

Trapianto e spostamento della coltura.

Altezza del prelievo (4 cm).

MONITORAGGIO DELLE QUANTITÀ ATTIVE DELLE IMMISSIONI.

Monitoraggio delle quantità reattive delle immissioni di fluoruro sotto forma di gas e di polvere nelle piante, con il metodo della coltura standardizzata .

VDI 3792 - Foglio 2 - Gennaio 1982

La proposta di questa Direttiva è stata sottoposta, con notifica alla Gazzetta Ufficiale (Federale), ad un aperto procedimento di opposizione.

INDICE

Premessa

- 1. Presupposti metodologici**
- 2. Allestimento della stazione di monitoraggio**
- 3. Realizzazione del monitoraggio**
 - 3.1 Esposizione e intervallo di misurazione
 - 3.2 Prelievo e preparazione dei campioni
 - 3.3 Definizione analitica
- 4. Valutazione dei risultati**
- 5. Parametri del procedimento**
 - 5.1 Valore stimato e valore provato**
 - 5.2 Scarto dai valori standard**
- 6. Possibilità operative**

Bibliografia

Appendice :

-Formulario. Questionario per la valutazione del metodo delle colture secondo la Direttiva-VDI Associazione Tedesca degli Ingegneri 3792 Foglio 2.

-Spiegazione del formulario

Commissione dell'Associazione Tedesca degli Ingegneri (VDI) per la conservazione dell'aria.

Commissione per l'attuazione dei procedimenti di rilevamento e monitoraggio.

Manuale per la conservazione dell'aria della VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri, Volume 1. Registro Nr 2.

PREMESSA

Emissioni di composti inorganici a base di fluoro possono interessare, sotto forma di particelle o di gas, in modo considerevole i seguenti rami dell'industria :

Stabilimenti di alluminio

Industrie del ferro

Officine di smaltatura

Fabbriche di vetro

Produzione e utilizzo di acido fluoridrico

Fabbriche di superfosfati

Fabbriche di argilla e grès

Bruciatori

Le piante assorbono i composti di fluoro delle immissioni attraverso gli organi di superficie e li concentrano nei tessuti.

Il fluoruro arriva nella pianta attraverso la stoma delle foglie. In una certa dimensione le particelle di fluoruro allo stato disciolto vengono assorbite anche attraverso la cuticola e l'epidermide delle foglie. Nella linfa delle piante il fluoruro disciolto viene portato nei tessuti della foglia attraverso il flusso della traspirazione (sommità e margini) e ivi concentrato. E' invece modesta la concentrazione di fluoruro nelle foglie, assorbita dal terreno attraverso le radici (vv Bibliografia 1).

Si registrano specifiche reazioni ed effetti tossici sulle piante in rapporto alla quantità risultante dalle immissioni (vedi Bibliografia 2). Sulla base di questi rapporti si evidenzia la necessità di una misurazione del contenuto di fluoruro negli (e sugli) organi di assimilazione (foglia, ago). La quantità delle immissioni di una sostanza, determinata dalla concentrazione, rappresenta la risultante del flusso di immissione con il meccanismo di assorbimento, assimilazione, ridistribuzione, trasformazione e separazione all'interno dell'accettore (vedi bibliografia 3 e 4).

Il contenuto della sostanza nelle piante, a prescindere dall'offerta dell'immissione, viene influenzato da numerosi fattori, che agiscono in primis sulla crescita delle piante. A ciò contribuiscono sia fattori endogeni, cioè i fattori genetici e quelli relativi alla crescita (ad esempio comportamenti specifici della specie e del genere, così come cambiamenti determinati dalla evoluzione nei confronti dell'assorbimento delle varie sostanze) che fattori esogeni, come ad esempio il rifornimento idrico e di sostanze nutritive, la composizione del substrato di crescita, le diverse escursioni meteorologiche. La condizione necessaria per una misurazione della quantità delle immissioni è che le piante utilizzate siano pienamente funzionali in qualità di accettore, all'interno di un campo il più possibile ampio per quanto riguarda il contenuto di sostanze nocive.

E' ad esempio ipotizzabile, che ad una concentrazione in aumento, dovuta ad un effetto di saturazione, corrisponda una minore assimilazione per unità di tempo. E' però anche possibile una diminuzione della assimilazione nel caso in cui sulle foglie compaiano delle necrosi o delle clorosi, ad esempio in seguito ad una concentrazione troppo elevata di fluoruro.

La quantità di immissioni rappresenta un metro per valutare il carico di inquinamento sulla vegetazione. Ove non sia possibile determinare la quantità di immissioni su tutte le piante verrà scelta in rappresentanza, come accettore rappresentativo per la misurazione, il *Lolium multiflorum lam* (vedi bibliografia 5), poichè la concentrazione F- nell'erba (campioni lavati) è anche proporzionale alla concentrazione nei diversi tipi di verdura, mangiata dagli uomini (vedi bibliografia 6).

L'erba appartiene a quel gruppo di piante che forniscono l'alimentazione agli animali. La concentrazione registrata su queste piante (campioni non lavati) è perciò proporzionale all'assunzione orale di fluoruro con il foraggio.

Anonologamente alla misurazione del fluoro nell'aria, non si può operare una distinzione rigorosa per la misurazione delle quantità fra immissioni di fluoro gassose e particelle solide e/o liquide contenenti fluoro, ne' da un punto di vista teorico, ne' da un punto di vista pratico (cfr bibliografia 7).

In conclusione, il procedimento che stiamo per illustrare non rileva solo i composti molecolari di fluoro presenti, ma anche già una parte di immissioni sotto forma di particelle.

1 PRESUPPOSTI METODOLOGICI

Seguendo il procedimento descritto nel foglio 1 di questa Direttiva (cfr bibliografia 8) coltiveremo colture di *Lolium multiflorum* Lam. (tipo : *Lema*) e le lasceremo esposte alle intemperie, in tutte le direzioni. Fungerà da accettore la massa del fogliame che verrà prodotta nel corso dell'intervallo di tempo della campionatura. L'unità di misura è costituita dal contenuto di fluoruro del substrato delle piante.

2 ALLESTIMENTO DELLA STAZIONE DI MONITORAGGIO

Il contenitore portante va avvitato ad un tubo metallico e collocato in modo che la distanza dalla superficie del terreno, misurata dall'angolo superiore del contenitore, sia di circa 1,50 m. Alberi, edifici e altri impedimenti possono disturbare il movimento dell'aria e mettere in ombra le piante. La distanza di questi impedimenti dalla stazione di monitoraggio deve essere, in linea di massima, almeno dieci volte superiore rispetto a quanto sporgono al di sopra dell'apparecchio stesso. In città o nei boschi non si può sempre seguire questa regola. Qui si potrà collocare, in via eccezionale, gli apparecchi in cortili interni, giardini e radure. Gli apparecchi di monitoraggio non possono però essere collocati su tetti, vicino ad alberi, nelle vicinanze di cantieri, su strade o su piazze pubbliche con forti emissioni del terreno. In casi di rimostranze sarà utile installare la stazione di monitoraggio proprio nel luogo cui si riferisce la segnalazione.

3 REALIZZAZIONE DEL MONITORAGGIO

3.1 ESPOSIZIONE E INTERVALLO DI MISURAZIONE

Per quanto riguarda l'esposizione e l'intervallo di misurazione, attenersi alle indicazioni contenute nel foglio 1 di questa direttiva. (cfr bibliografia 8).

3.2 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Dopo la conclusione del suindicato intervallo di misurazione estraiamo il contenitore della coltura da quello portante, lo mettiamo in un contenitore da trasporto e lo portiamo in laboratorio per il prelievo del campione.

A partire da questa fase e in tutte le manipolazioni successive, fino all'analisi chimica, va evitata ogni ulteriore contaminazione-F.

Prima del prelievo dal contenitore dovrà essere verificata la condizione esterna dell'accettore. Si procederà quindi secondo i criteri esposti nel formulario qui allegato, in base ai quali giudicheremo sia lo sviluppo della crescita, che i danni macroscopici riconoscibili di natura biotica e abiotica, così come gli strati di polvere.

Il fogliame prodotto nel corso dell'intervallo di misurazione verrà tagliato il giorno stesso o, al più tardi, il mattino dopo (sistemare il contenitore in una stanza luminosa ma chiusa). La porzione tagliata sarà mediamente di 4-5 cm. In generale è, invece, da evitare il prelievo di fogliame che abbia superato i 14 giorni. Il campione è da buttare quando il peso fresco delle foglie prelevate ammonta a meno di 10 gr, o nel caso in cui si producano perdite di sostanze intorno alla sommità della foglia, dovute a danneggiamenti meccanici (ad esempio perchè mangiate da animali, o rovinata dalla grandine). Finquanto queste perdite sono limitate solo ad una parte di materiale vegetale, potremo utilizzare il resto per l'analisi, se intatto.

Per allontanare le particelle di polvere e di terra presenti sul fogliame, laveremo due volte i campioni sotto l'acqua corrente, ogni volta per 30 secondi e le sciacqueremo infine con acqua deionizzata. Il campione verrà sistemato su vassoi e seccato a circa 80° (essiccatoio ventilato) per circa 15 ore, fino a raggiungere stabilità nel peso. Dopodichè determineremo gravimetricamente il peso secco del campione, lasciato raffreddare a temperatura ambiente. Nell'ultima fase di lavoro sbricoleremo grossolanamente il

materiale vegetale e lo macineremo in un comune macina-caffè dotato di lama. A questo punto dovranno mancare circa il 30-40% di particelle sulla frazione < 0,25 mm fino a > 0,1 mm e circa il 60-65% di particelle sulla frazione < 0,1 mm. Il macinino, dopo ogni operazione, deve essere pulito con un pennellino e soffiando fuori con l'aria compressa. Il campione, una volta macinato, dovrà essere conservato in contenitori di polietilene. I campioni che non potranno essere macinati subito dopo l'essiccazione, dovranno essere in ogni caso conservati in contenitori ermetici di polietilene. Prima di macinarli si consiglia una ulteriore essiccazione di circa un'ora a 80° C.

3.3 DEFINIZIONE DELL'ANALISI

L'analisi chimica dei campioni dovrà essere eseguita seguendo il metodo descritto nella Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 3795 Foglio 2 (cfr Bibliografia 9).

4. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Il contenuto di fluoruro nel materiale vegetale verrà relazionato sulla sostanza seccata assoluta e indicato in µg/g del materiale seccato, in base al calcolo della Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 3795 Foglio 2.

5. PARAMETRI DEL PROCEDIMENTO

5.1 VALORE STIMATO E VALORE DIMOSTRATO

In relazione al contenuto di fluoruro della terra e della semenza va fissato, per tutte le campionature, un valore ipotetico. Questi dovrà essere determinato attraverso l'utilizzo della disposizione di monitoraggio completa in camere (contenitori) con aria filtrata e priva di fluoruro (cfr bibliografia 12); grazie a questo procedimento saremo in grado di ricavare anche il valore dimostrato (vedi i suggerimenti contenuti nella Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 2449 Foglio 1 e nel punto 13 della Bibliografia). A causa della peculiarità del metodo biologico, in cui la messa a punto della campionatura per la singola misurazione deve essere di volta in volta eseguita da capo, il valore ipotetico e il limite dimostrato dovranno essere rideterminati annualmente, o nel caso di un nuovo carico di substrato di crescita o della soluzione nutritiva.

Ad esempio, nei diversi anni, sono stati rilevati i seguenti valori :

ANNO	Valore stimato/ dimostrato [µg/g]
1973	3.53 / 4.97
1974	5.63 / 11.45
1975	2.58 / 4.89
1976	2.96 / 7.52
1977	5.43 / 7.22
1978	4.80 / 8.25

5.2 SCARTO DAI VALORI STANDARD (cfr Bibliografia 13 e 14)

Per l'intero processo di monitoraggio, che comprende la produzione di colture erbacee in qualità di accettore, la campionatura e la determinazione analitica, è stato determinato lo scarto dai valori standard sD così come la riproducibilità $R = \bar{x} / sD$ in sette classi (contenuto di fluoruro, riferito al centro della classe \bar{x}). Il risultato è stato riportato nella seguente tabella:

Classe	Sd	Sd rel R	Numero	
$\mu\text{g/g TS}$	$\mu\text{g/g TS}$	%	doppie det . N	
da 0 a 19	2,73	19,9	5,0	68
da 20 a 39	3,07	10,5	9,6	65
da 40 a 59	5,93	11,9	8,4	35
da 60 a 79	6,07	9,1	11,0	19
da 80 a 99	11,55	13,6	7,4	10
da 100 a 159	11,11	9,3	12,9	12
da 160 a 239	15,57	7,7	12,0	12

Per la determinazione degli scarti dai valori standard sono stati utilizzati i risultati di rilevamenti ricavati da stazioni di monitoraggio variamente inquinate.

6 POSSIBILITA' OPERATIVE

Con questo metodo non sono richieste particolari conoscenze tecniche per il ricambio delle colture sul territorio. Tutte le fasi che necessitano di precise cognizioni tecniche saranno condotte in laboratorio.

Le colture raggiungono la loro piena funzionalità nel periodo che va da maggio a ottobre (eventualmente anche novembre). Il monitoraggio delle quantità reattive delle immissioni secondo il metodo descritto è perciò limitato a questo lasso di tempo. Verrà così rilevato l'inquinamento delle piante nel periodo più intenso del processo di crescita.

Vaste conoscenze sui rapporti fra le quantità attive di fluoruro delle immissioni nelle colture erbacee standardizzate e il danneggiamento di altre piante più evolute confermano l'aumento di questo componente come criterio per la valutazione della minaccia per le diverse specie vegetali (cfr Bibliografia 6 e 15). Possiamo inoltre quantificare la minaccia che ciò costituisce per gli animali, dalla quantità attiva delle immissioni in colture standardizzate, in base al rapporto fra una contaminazione di fluoruro nelle piante foraggere e gli effetti tossici su animali da pascolo sensibili.

FORMULARIO (per la tabella, vv. pag. 6 dell'originale).

Questionario di valutazione per il procedimento delle colture secondo la Direttiva VDI-Associazione Tedesca degli Ingegneri 3792 Foglio 2.

Introduzione alla valutazione delle colture per la campionatura (Spiegazione del formulario).

Colonna 1: Contrassegno, caratteristica della stazione di monitoraggio e del campione.

Colonna 2: Situazione generale

Sotto il criterio "Situazione generale" verrà descritta l'impressione complessiva della coltura, tenendo conto della densità (del patrimonio forestale), della larghezza delle foglie, della coloritura delle foglie e della altezza dei fusti. Al riguardo dovremo tener conto del fatto che la crescita della pianta, ad esempio la crescita in altezza, varia a seconda delle varie condizioni climatiche durante il periodo vegetativo che va da maggio a ottobre.

La valutazione avviene in tre stadi secondo la seguente classificazione:

0 non valutato

1 buono

2 medio

3 cattivo

Colonna 3 : Altezza dei fusti

Dati in cm, misurati dalla superficie del substrato. Si dovranno misurare le altezze medie e non quelle delle punte delle foglie più lunghe.

Colonna 4 : (colonna doppia) Dati riguardanti l'ampiezza delle foglie, suddivisa in : ampie, medie, affusolate. I dati riguardanti la coloritura delle foglie verranno classificati in : verde scuro, verde, verde chiaro fino a verde giallognolo.

Colonna 5 : (colonna suddivisa in tre parti) tratta del tipo di danneggiamento:
Nella colonna a sinistra collochiamo il danneggiamento "generale", (ad esempio cambiamento di colore e necrosi), causato da fattori climatici, tecnici riguardanti le colture o altri che ne danneggino la crescita.

Dovremo utilizzare al riguardo i seguenti gradi di valutazione :

- 0 non valutato
- 1 nessuno
- 2 debole
- 3 medio
- 4 forte

Il tipo di danneggiamento "particolare" (seconda e terza parte della colonna) comprende i seguenti effetti :

- 1 avvizzimento dovuto alla mancanza di acqua
- 2 danni causati da tempeste, grandine, gelo
- 3 danni derivati di insetti nocivi (foglia rosicchiata)
- 4 danni derivati da animali da pascolo (foglie rosicchiate)
- 5 danni da malattie (ruggine, melata etc)
- 6 danni derivanti da pesticidi
- 7 danni dovuti all'effetto di immissioni
- 8 ulteriori danni, che verranno commentati nella colonna 8.

Nella ultima parte della colonna ("grado"), va registrata la potenza della comparsa del danneggiamento di tipo particolare, indicato nella parte precedente di questa colonna.

I gradi di valutazione sono da utilizzare conformemente a quelli indicati nella prima parte della colonna 5 (" Danneggiamenti di tipo generale").

Colonna 6 (doppia): Polvere.

Nella parte sinistra della colonna, "Tipo", registriamo la natura delle polveri in base ai seguenti numeri indice :

- 0 nessuno strato di polvere
- 1 polveri scure, a granelli grossi
- 2 polveri scure, a granelli piccoli
- 3 polveri scure, fuliginose, a fiocchi
- 4 polveri scure, oleose, unte
- 5 polveri chiare, a granelli grossi
- 6 polveri chiare, a granelli piccoli
- 7 polveri chiare, a fiocchi
- 8 polveri chiare, oleose, unte
- 9 particelle di terra di tutti i tipi

Nella parte destra della colonna 6 verrà registrata l'intensità della comparsa delle polveri, registrate nella parte sinistra di questa stessa colonna, analogamente allo schema per la valutazione dei danni (cfr colonna 5).

Colonna 7 : Materia secca, dati in mg.

Colonna 8 : Annotazioni varie.

MISURA DELLA QUANTITÀ ATTIVA D'IMMISSIONE NELLE FOGLIE E NEGLI AGHI
DEGLI ALBERI NELLA LORO UBICAZIONE NATURALE
VDI 3792 - Foglio 5 – Giugno 1991

Contenuto:

Premessa

1. Scelta dei siti di misura
2. Scelta della specie d'albero
3. Scelta degli alberi di misura
4. Tempo di prelevamento
5. Prelevamento di campione
 - 5.1 Note generali
 - 5.2 Conifere
 - 5.3 Latifoglie

6. Preparazione dei prelevamenti

Appendice: modulo per il rilevamento dei dati d'ubicazione

Premessa

Le piante si addicono particolarmente alla dimostrazione dell'influenza dell'inquinamento dell'aria sull'ambiente. In questo senso vengono utilizzate nella misurazione che serve a rilevare i danni nella vegetazione, nonché per la delimitazione e la sorveglianza delle regioni soggette a inquinamento [1; 2; 8;9].

Contrariamente ai metodi con piante standardizzate, come quelli con colture erbacee [3; 4], la presente direttiva descrive le misure della quantità attiva d'immissione [5;6] su piante della vegetazione naturale. Per queste misure sono particolarmente adatte le piante pluriennali, soprattutto gli alberi. Alla fine del periodo vegetativo, (per gli effetti vedere VDI 2310 parte 1 [26]) oppure dopo lunghi periodi, si può accertare, come risultato di misurazioni, il contenuto di un elemento d'immissione accumulato, mentre gran parte dei procedimenti di esposizione, integra durante un periodo molto più breve.

Per quanto riguarda la rilevanza e la significatività del procedimento di misura qui trattato, si fa riferimento ai paragrafi 5 e 6 (richiamo alle pubblicazioni di Scholl Schwela [6] e Guderian [7]). A seconda della formulazione della domanda, c'è la possibilità di fare accertamenti sugli effetti con la vegetazione cresciuta, con piante esposte oppure combinando i due metodi.

L'utilizzo delle piante come accettori per i componenti che inquinano l'aria ha i suoi limiti, limiti diversi a seconda del tipo d'immissione. Per esempio la quantità attiva d'immissione dei componenti che dalle piante vengono incluse nel metabolismo, fra l'altro, hanno un carattere nutritivo (as es. ossidi d'azoto), è misurabile in modo molto impreciso con un'analisi delle foglie (ad es. azoto totale). D'altro canto, i componenti delle immissioni, che non evidenziano alcuna funzione per le piante o che appartengono ad oligoelementi o che producono effetti tossici a piccole dosi (come ad es. molti metalli pesanti o fluoruri), producono un aumento significativo degli elementi interessati. In questo caso, è relativamente semplice evidenziare l'aumento del contenuto di azoto dovuto alle immissioni perchè è minimale e si trova in genere entro l'ambito di divergenza del contenuto naturale.

D'altronde quegli elementi immessi che non hanno una funzione per la pianta o servono da microelementi, oppure che hanno un effetto tossico (come ad es. molti metalli pesanti o i fluoruri) portano ad aumenti significativi della concentrazione.

In tal caso l'accertamento di un danno d'immissione è relativamente facile e preciso.

Una posizione intermedia tra questi due estremi hanno per esempio le immissioni di zolfo riguardo all'aumento del contenuto di zolfo naturale nelle piante [7].

Più alto è il contenuto naturale di un elemento e più è difficile l'accertamento del suo aumento avvenuto dall'aria tramite un'analisi chimica sulle foglie. Perciò va ridotto l'influenza di condizioni marginali mediante la standardizzazione dei prelevamenti, in modo che il valore di misura risulti dalle oscillazioni naturali.

In seguito verranno elencati i criteri per la scelta dei posti di misurazione delle piante, del prelevamento e della prelevazione di esso.

1 Scelta dei siti di misura

I siti di misura devono essere rappresentativi per le zone da esaminare.

Se esistono riprese aerofotografiche della zona d'esperimento, i siti di misura possono essere preselezionati. La scelta definitiva avverrà poi percorrendo la zona in questione. Le riprese aerofotografiche hanno inoltre il vantaggio di far vedere, soprattutto in ambiti cittadini poveri di vegetazione, alberi e altre piante dentro i cortili nascosti, ecc. La grandezza delle zone di misura e la densità dei siti di misura dipendono dal tipo di formulazione della domanda. Si consiglia di attenersi alle indicazioni del Comitato Tecnico del Controllo della Qualità dell'Aria (Ta-Luft).

2. Scelta delle specie d'albero

Valgono i seguenti presupposti: gli alberi delle specie da scegliere devono

- essere presenti nella regione d'esame con una certa conformità di età e con una sufficiente densità,
- accumulare bene la sostanza d'immissione dall'aria e poco quella dal terreno.

Se in una regione una specie non è rappresentata ovunque, si può anche passare ad un'altra specie; ma questo presuppone un prelievo delle due specie in moltissimi siti di misura, per poter stabilire una correlazione dei valori di misura sulle due specie.

3. Scelta degli alberi da misurare

Gli alberi da misurare vengono scelti negli incroci del reticolo stabilito, poi marcati ed iscritti, con dati di ubicazione, su un modulo (vedi appendice). Divergenze dai punti di misura stabiliti non dovrebbero superare il $\pm 10\%$ della distanza tra i siti di misurazione.

Gli alberi prescelti non dovrebbero presentare sintomi di danneggiamento dimostrabile, perchè un arricchimento indisturbato di sostanze nocive avviene soltanto in un tessuto intatto. Bisogna scegliere quegli alberi che sono aperti alla influenza da tutti i lati nella parte della corona da cui si devono fare i prelievi (vedi paragrafo 5). Se più alberi sono disponibili in un posto di misura, ad es. in un bosco, bisognerebbe effettuare un prelievo misto da almeno tre alberi. Alberi singoli dovrebbero essere distanti dagli altri.

4. Tempi di prelevamento

Il periodo di prelevamento è nella tarda estate fino all'autunno, prima che il fogliame cambi colore. Nelle conifere i prelevamenti sono possibili anche dopo, fino all'inizio dell'inverno.

Se sono previste conifere e latifoglie insieme, allora i prelevamenti vanno effettuati contemporaneamente.

In generale il periodo di prelevamento è da ridurre al minimo e non dovrebbe superare tre settimane. Nel caso di misure fatte in anni diversi, bisogna badare ad un prelevamento effettuato in uno stato fisiologico paragonabile delle foglie.

5. Prelevamento di campione

5.1 Note generali

Il prelevamento deve avvenire dappertutto alla stessa altezza della corona esposta all'aperto. I prelevamenti parziali dovrebbero essere della stessa quantità e, per motivi di rappresentanza, rendere un totale di almeno 6 g. di sostanza asciutta analizzabile. Il prelevamento può essere eseguito con delle forbici su bastone oppure con un rampichino o con un veicolo munito di impianto di sollevamento. I prelevamenti freschi, avvolti in sacchetti di polietilene, vanno portati il giorno stesso al laboratorio e quindi preparati. Se ciò non è possibile, bisogna tenerli al fresco (ca. 4° C), ma fino alla preparazione non deve trascorrere più di una settimana.

Inoltre vanno accertati i dati richiesti nel modulo (vedi appendice) e poi protocollati.

5.2 Conifere

Il prelevamento viene effettuato sul 6° - 8° verticillo da sopra, come si usa nell'ambito forestale. Possibilmente dovrebbe essere prelevato, oltre la prima annata degli aghi, anche la seconda e la terza, per ottenere un'informazione sull'influenza dei tempi di arricchimento prima dell'ultimo periodo di vegetazione.

5.3 Latifoglie

I rami vanno prelevati sempre alla stessa altezza dal suolo. Di questi rami si utilizzano poi sempre le foglie più vecchie delle diramazioni più forti, cioè quelle foglie che erano uscite per prime e che hanno dunque avuto una esposizione durante il periodo di vegetazione.

6 Preparazione dei prelevamenti

Nel maneggiare i campioni dal prelievo fino al momento dell'analisi si dovrà prestare particolare attenzione a non contaminare i campioni stessi con i sostanze delle immissioni misurati (ad es. durante il procedimento della macinazione).

I prelevamenti dalle conifere vanno divisi nei getti annuali da analizzare e poi elaborati separatamente. Le foglie dei prelevamenti dalle latifoglie vengono liberate dai gambi. A seconda della domanda posta può essere necessaria o l'elaborazione di prelevamenti lavati oppure non lavati. Nel primo caso, i prelevamenti vengono lavati due volte per 30 secondi con acqua di rubinetto e una volta con acqua deionizzata per sciacquare. Il lavaggio avviene sui prelevamenti ancora freschi e turgescanti. Il materiale vegetale va poi essiccato in un armadio essiccatore con circolazione d'aria, a 80°C., mentre viene rivoltato varie volte. nei prelevamenti dalle conifere è facile staccare gli aghi dai pezzi di rami.

I prelevamenti vengono poi macinati (ad es. in un macinino per il caffè con coltello a percussione) e conservati in contenitore polietilene.

Se le analisi non avvengono immediatamente, i prelevamenti dovrebbero essere tenuti nel congelatore o almeno in una temperatura di -5°C., per evitare eventuali perdite di sostanza. Prima della futura analisi si raccomanda una seconda essiccazione di ca. 1 ora a 80°C..

La finezza della macinazione dipende dal peso necessario per l'analisi, cioè più basso è il peso e più raffinata deve essere la materia macinata (il valore per il peso di 1g.: grandezza del granello, inferiore a 0,2 mm.).

Il macinino va pulito dopo ogni prelevamento usato con un pennello e soffiando con aria compressa sotto uno sfogo. In tutte le manovre dal prelevamento all'analisi bisogna stare molto attenti al pericolo di contaminazione dei prelevamenti con le sostanze d'immissione che si vogliono misurare (ad es. nella macinazione).

Appendice: Modulo per il rilevamento di dati d'ubicazione

Rete di misura

Descrizione dell'ubicazione

Proprietario dell'albero e indirizzo

1 Dati generali

alto valore

valore di diritto

anno di rilevamento

2 Dichiarazioni sull'albero indicatore

distanza dal punto teorico in m.

altezza (m)

diametro all'altezza del petto in cm.

classi d'età naturali

0=nessuna informazioni

1=piante giovani

2=macchia

3=bosco giovane

4=alberi

5=bosco maturo

albero singolo

gruppo

posizione sociale nel patrimonio

1=predominante

2=dominante

3=co-reggente

esposizione preferita della chioma

nessuna informazioni

nessuna direzione

N

NE

E

SE

S

SW

W

NW

in tutte le direzioni

3 Dichiarazioni sulla popolazione

composizione delle specie arboree

0=nessuna informazioni

1=patrimonio di abeti rossi

2=patrimonio di pini

3=patrimonio di conifere miste

4=patrimonio misto di latifoglie e conifere

5=patrimonio di latifoglie miste

grado di chiusura

0=nessuna informazioni

1=lacunoso

2=ampio

3=rado

4=chiuso

5=stretto

4 Dichiarazione sull'ubicazione

altezza sopra la quota 0 in m.

unità di volume naturale (secondo Schmitthusen)

sfruttamento di superficie nell'ubicazione

nessuna informazioni

terreni incolti

palude

bosco

praterie

terreno arabile

frutticoltura e viticoltura

orti di famiglia

parco

regione rurale

regione cittadina

zona artigianale

zona industriale

traffico

forma del paesaggio

00=nessuna informazioni

01=pianura/leggermente ondulato

02=colline

03=cupola, dorso

04=sella

05=pendio

06=pendio superiore

07=pendio medio e inferiore

08=conca

09=valle di ruscello o fondovalle
10=altre forme

inclinazione del paesaggio

0=nessuna informazioni
1=piatto o quasi (0°-2°)
2=poco inclinato (2°-5°)
3=leggermente inclinato (5°-10°)
4=moderatamente ripido (10°-15°)
5=ripido (15°-20°)
6=molto ripido (20°-30°)
7=scosceso (30°-40°)
8=molto scosceso (più di 40°)

direzione pendio

nessuna informazione

N
NE
E
SE
S
SW
W
NW
piatto

5 Dichiarazioni sulla precipitazione atmosferica

(stazione di misura più vicina; in mm)

precipitazione media annua

precipitazione media nel semestre estivo (aprile - settembre)

precipitazione media nel semestre invernale (ottobre - marzo)

6 Dichiarazioni sul terreno

(secondo carta geografica del terreno 1:5000)

ROSELECTRA S.p.A.

**Biomonitoraggio Integrato e Avanzato
per lo studio delle ricadute saline
derivanti dal drift delle torri evaporative
nel territorio di Rosignano Solvay**

Relazione tecnico-scientifica
Biomonitoraggio attivo

Allegato 4: Moss-bags Metodiche approvate ANPA
Pubblicazioni di riferimento



PROPOSTE METODOLOGICHE PER L'USO DI BRIOFITE COME BIOACCUMULATORI DI METALLI IN TRACCIA

Miris Castello

Dipartimento di Biologia, Università di Trieste

Roberto Michele Cenci

CCR, Ispra

Renato Gerdol

Dipartimento di Biologia, Sezione di Botanica, Università di Ferrara

RIASSUNTO

Viene presentata una proposta di normativa per il monitoraggio della deposizione di metalli in traccia mediante analisi di tessuti di muschi. Nelle stazioni di campionamento, localizzate secondo la griglia dell'Inventario Forestale Nazionale, dovranno essere raccolti tessuti freschi in popolazioni spontanee di muschi epigei pleurocarpi. In alternativa, si potrà ricorrere alla tecnica dei "moss bags".

ABSTRACT

A protocol for biomonitoring trace metal deposition based on moss analysis is described. Sampling plots should be located, at varying densities, within the grid adopted by the Italian National Forest Inventory. Fresh material of carpet-forming moss species should be collected at open areas. Alternatively, the moss-bag technique can be used.

1. GENERALITÀ

Tessuti di briofite possono essere efficacemente utilizzati per il monitoraggio di metalli in traccia deposti in un arco di tempo variabile da alcune settimane ad alcuni anni. Le briofite rappresentano infatti eccellenti accumulatori passivi di metalli in traccia in virtù dell'elevata capacità di scambio cationico della loro parete cellulare. Inoltre, le briofite presentano spesso una forma di crescita a tappeto che può dar vita a tappeti muscinali anche molto estesi. Infine, alcune specie di muschi del suolo vivono comunemente in ambienti privi di una rilevante copertura di vegetazione vascolare, sia legnosa che erbacea.

Le caratteristiche sopra ricordate garantiscono una serie di vantaggi nell'uso di questa tecnica:

- a) effettuando il campionamento su muschi del suolo in aree non direttamente coperte da chiome di alberi o da vegetazione erbacea viene monitorato esclusivamente l'apporto diretto di metalli in traccia ad opera della precipitazione atmosferica, annullando il disturbo dovuto a percolazione dalle chiome;
- b) rispetto a tecniche di bioaccumulo basate sull'uso di foglie di alberi o di licheni epifiti è possibile effettuare il monitoraggio basato su muschi anche in aree del tutto prive di vegetazione arborea (ad esempio i territori extrasilvatici a clima freddo);
- c) è talora possibile effettuare il monitoraggio anche in aree soggette a marcato inquinamento utilizzando specie muscinali tossi-tolleranti; inquinamento utilizzando specie muscinali tossi-tolleranti;
- d) la concentrazione dei metalli in traccia nei tessuti di muschio è correlata con il tasso di apporto atmosferico dei medesimi.

La principale limitazione all'utilizzo ricorrente di briofite autoctone per il monitoraggio di metalli

in traccia consiste nel fatto che non sempre risulta possibile reperire tappeti di muschi spontanei in aree aperte. In tali casi si può in parte ovviare a questo inconveniente facendo ricorso alla cosiddetta tecnica dei "moss bags".

2. STRATEGIA E SCALA DI CAMPIONAMENTO

Il monitoraggio di metalli in traccia nei tessuti muscinali ha l'obiettivo di valutare la deposizione di metalli in rapporto a potenziali fonti di inquinamento. A seconda della scala geografica perseguita sarà opportuno definire griglie di campionamento a diversa densità. Di conseguenza, l'effetto dell'emissione e del trasporto degli inquinanti sui livelli di deposizione rilevati nel monitoraggio sarà valutato a livelli di dettaglio compatibili con la scala e con la densità dei punti di campionamento.

Per la localizzazione dei punti di campionamento è preferibile fare riferimento a griglie già utilizzate a scala nazionale o internazionale, come ad esempio il sistema di campionamento utilizzato per l'Inventario Forestale Nazionale. Tale sistema è costituito da una rete di punti situati sul territorio secondo una maglia di 3 x 3 km. Di questi punti, un sottocampione selezionato secondo una maglia di 15'8 km afferisce alla rete europea EU-UN/ECE per il rilevamento dei danni alle foreste causati dall'inquinamento atmosferico sotto gli auspici dell'"European Union scheme on the protection of forests against atmospheric pollution" e della CLRTAP "Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution". La rete di base di 3'3 km consente quindi diverse densità di campionamento, sia regolari (3'3, 6'6, ecc.), che a maggiore densità nel senso della latitudine (3'6, 3'9, ecc.) o della longitudine (6'3, 9'3, ecc.).

A) *Monitoraggio a scala regionale o nazionale.* Di norma ha l'obiettivo di delineare tendenze ad ampia scala nei livelli di deposizione atmosferica di metalli in traccia. Indagini di tale tipo risultano in genere inadeguate per un monitoraggio dettagliato di fonti locali di inquinamento, ma possono rivelarsi essenziali per rivelare fonti di inquinamento a lunga distanza.

Le stazioni corrisponderanno ciascuna a un quadrato di 1 km². Qualora venga adottata la griglia dell'Inventario Forestale Nazionale, ogni punto potrà essere centrato all'intersezione delle maglie del reticolo. A seconda della scala e delle caratteristiche del territorio la griglia potrà corrispondere alla rete di base (3'3 km; ved. sopra) o a un reticolo più ampio (fino a 15'18 km nei progetti nazionali e internazionali). Qualora la stazione non possieda popolazioni autoctone di muschi si potrà, se del caso, utilizzare la tecnica dei moss bags. Altrimenti la stazione verrà trattata come dato mancante.

Nelle indagini di bioaccumulo a scala regionale o più ampia è importante collocare i punti di campionamento a debita distanza da sorgenti puntiformi di emissione. Si propone pertanto di seguire l'indicazione dell'European Heavy Metal Survey (EHMS), effettuando il campionamento ad almeno 200 m da strade di grande traffico e almeno 50 m da abitazioni e strade minori.

B) *Monitoraggio a scala locale.* Di norma, ha l'obiettivo di seguire in dettaglio il percorso di ricaduta di metalli in traccia emessi da sorgenti puntiformi (ad esempio inceneritori, centrali termoelettriche, impianti manifatturieri, strade e autostrade). In questo caso le stazioni andranno riferite a una griglia più stretta rispetto alla rete di base. Ad esempio, quest'ultima potrà essere suddivisa in quadrati di 250 x 250 m entro i quali effettuare il campionamento.

Questo verrà effettuato utilizzando popolazioni naturali di muschio o, in alternativa, ricorrendo alla tecnica dei moss-bags.

In casi particolari, potrà essere opportuno dislocare le stazioni in punti particolari (ad esempio lungo transetti secondo un'ipotetica linea di ricaduta delle emissioni), anche svincolati da un particolare reticolo.

Nelle indagini di bioaccumulo a scala locale non è essenziale - e a volte non risulta nemmeno possibile-effettuare il prelievo dei campioni di muschio a una distanza minima da strade ed edifici. Qualora possibile, è comunque opportuno evitare che il sito di campionamento sia posto al bordo di strade a intenso traffico. Le emissioni dei gas di scarico potrebbero infatti alterare i livelli di deposizione provenienti dalla fonte oggetto del monitoraggio.

3. TAPPETI MUSCINALI COME BIOACCUMULATORI DI METALLI IN TRACCE

Le tecniche di campionamento e preparazione dei campioni seguono essenzialmente il protocollo adottato nell'EHMS (Rühling, 1994). Ulteriori indicazioni si possono reperire in Zechmeister (1997).

Campionamento

1) Bisogna assolutamente evitare che il tappeto muscinale subisca il percolamento delle chiome degli alberi o, comunque, del fogliame di arbusti o erbe. E' pertanto indispensabile che il campionamento venga effettuato a una distanza minima di 3 m dal limite della proiezione al suolo della chioma dell'albero più vicino, in aree a modesta copertura di vegetazione vascolare.

2) Il campionamento va effettuato su tappeti muscinali costituiti da un'unica specie. Potranno essere utilizzate le seguenti specie: *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberi* (queste due specie limitatamente ai territori montuosi del Nord Italia); *Hypnum cupressiforme*, *Scleropodium purum*, *Abietinella abietina* (diffuse più o meno regolarmente su tutto il territorio nazionale). L'utilizzo di altre specie (ad esempio *Brachythecium* spp., *Eurhynchium* spp, *Thuidium tamariscinum* e *Ctenidium molluscum*) è sconsigliato e, comunque, consentito solo qualora vengano forniti dati di confronto con analisi effettuate su una delle specie sopra citate.

3) Il campionamento va effettuato in un'area di alcune decine di m². Qualora non siano presenti popolazioni muscinali così estese, può essere sufficiente un tappeto continuo di 1 m². In ogni caso è indispensabile raccogliere nel tappeto muscinale 5-10 subcampioni scelti a caso, oppure secondo una griglia a numeri randomizzati, in modo da annullare possibili distorsioni prodotte da variazioni a piccola scala nelle concentrazioni di metalli in traccia (sperimentalmente valutate attorno al 20%).

4) Il materiale complessivamente raccolto nell'area campionata dev'essere pari a un volume di 1-2 litri, corrispondente a un peso fresco di 50-100 g (gli ambiti di variazione dipendono dal portamento della specie campionata e dal grado di idratazione dei tessuti). Il campionamento va limitato alla parte superiore del tappeto muscinale per minimizzare l'effetto suolo.

5) Per la raccolta vanno usati guanti in lattice. Va evitato l'uso di guanti in vinile, spesso cosparsi di talco. Durante il campionamento è assolutamente vietato fumare. Al momento del campionamento è opportuno effettuare una prima pulitura del materiale eliminando foglie, terriccio, ramoscelli e altro materiale estraneo. Il campione cumulativo va risposto in un sacchetto di nylon pulito, non traforato, da sigillare accuratamente al termine del campionamento.

Preparazione dei campioni

6) Il campione va rimosso quanto prima dal sacchetto e posto ad asciugare all'aria per 3-4 giorni. Va poi trasferito in un sacchetto di carta che andrà custodito in un ambiente asciutto. Se si avrà cura di osservare scrupolosamente queste semplici regole, il campione potrà essere conservato per molti mesi qualora non sia possibile prepararlo in tempi brevi.

7) In laboratorio il campione precedentemente seccato va disposto su un piano di PVC o ceramica e ripulito da ogni impurità avendo cura di utilizzare sempre guanti di lattice.

8) Ai fini delle analisi vanno considerati solo i tessuti più recenti, comprendenti la parte apicale verde e i tessuti sottostanti non ancora soggetti a decomposizione. Di norma il campione così

selezionato corrisponde ai tessuti formati nei 3-4 anni precedenti il campionamento. A seconda della specie e dell'habitat questi possono corrispondere a un segmento di lunghezza molto variabile (da 2 a 10 cm). La selezione del materiale potrà essere effettuata facilmente strappando i tessuti più recenti con le mani opportunamente protette da guanti in teflon.

4. "MOSS BAGS" COME BIOACCUMULATORI DI METALLI IN TRACCE

La tecnica qui proposta, introdotta da Goodman & Roberts (1971), si basa sulle capacità di accumulo dei muschi e prevede l'esposizione di sacchetti di muschio, opportunamente preparati, per un periodo massimo di 9 settimane. Di seguito si fornisce una breve descrizione della metodica, che si ispira alle numerose esperienze realizzate soprattutto nell'Europa settentrionale, con alcune modifiche che tengono conto della realtà italiana (Castello, 1996).

La specie impiegata per lo studio del bioaccumulo di metalli tramite moss bags sarà *Hypnum cupressiforme*, un muschio molto comune in Italia. Verrà scelta, in particolare, la varietà *filiforme*, facilmente reperibile soprattutto sui tronchi d'albero.

Campionamento

- 1) La raccolta del materiale per la preparazione dei moss bags va fatta preferibilmente in un'aggiornata e in un'unica stazione di campionamento, posta in aree possibilmente naturali, lontane da evidenti fenomeni di inquinamento.
- 2) I tappetini di muschio vengono prelevati dal tronco di uno o più alberi, che possono appartenere anche a generi diversi.
- 3) Si devono evitare situazioni di campionamento disomogenee o situazioni di evidente disturbo, costituite da:
 - 3a) tronchi d'albero eccessivamente inclinati o contorti;
 - 3b) parti del tronco con periodico percolamento di acqua;
 - 3c) presenza di fili metallici, verniciature, ecc.
- 4) E' consigliabile effettuare numerosi prelievi di tappetini di muschio in punti diversi dei tronchi. In questo modo il materiale risulterà più omogeneo e meno influenzato dalla variabilità naturale nella concentrazione dei metalli nei tessuti muscinali.
- 5) I prelievi vanno effettuati ad un'altezza da terra superiore ai 100 cm per evitare forti contaminazioni da materiale terrigeno.
- 6) Le dimensioni dei tappetini possono essere diverse; i tappetini vengono prelevati in toto, senza distinguere le parti basali più vecchie, di colore bruno, dalle parti apicali più giovani, di colore verde.
- 7) I tappetini di muschio vengono asportati dai tronchi con l'uso di un temperino in acciaio inossidabile. Il materiale viene poi inserito in una o più buste di carta da filtro.
- 8) La quantità di materiale da campionare va stimata considerando i seguenti punti:
 - 8a) la quantità di muschio di un moss-bag corrisponde a 400 mg di materiale secco;
 - 8b) si deve stabilire in anticipo il numero totale di campioni di moss-bags che verranno successivamente esposti nell'area di indagine;
 - 8c) per effettuare una valutazione dei valori contaminazione dei campioni di muschio prima dell'esposizione, vanno analizzati almeno 5 campioni (ca. 200 mg ciascuno), prelevati dal materiale pronto per l'esposizione.

Realizzazione dei moss-bags

- 9) I tappetini di muschio vengono portati in laboratorio per la preparazione entro 1-2 giorni dal campionamento. I campioni vengono sottoposti ad una pulizia grossolana, volta alla rimozione di terriccio, pezzi di corteccia d'albero o di foglie ed altri elementi estranei; è consigliabile effettuare la pulizia al microscopio binoculare con l'aiuto di pinzette in acciaio inossidabile. Non si separano i tessuti verdi più giovani da quelli senescenti di colore bruno, ma vanno rimosse le parti molto sporche di terriccio.

10) I tappetini di muschio ripuliti vengono riuniti, formando un unico campione da sottoporre al lavaggio.

11) La procedura del lavaggio prevede l'esecuzione di ripetuti brevi lavaggi del materiale in acqua distillata. Ogni lavaggio dura alcuni minuti (5-10 minuti): il materiale viene posto in un unico recipiente contenente acqua distillata, delicatamente agitato e quindi rimosso, per essere poi sottoposto al lavaggio successivo con altra acqua. Si consiglia l'effettuazione di 7 lavaggi successivi, che assicurano una migliore efficienza di rimozione dei metalli, ed in particolar modo dei metalli associati al particolato.

12) Il materiale viene fatto asciugare all'aria.

13) L'allestimento dei moss bags avviene entro 1-2 giorni dalla fine del trattamento, secondo la seguente procedura:

13a) si utilizzano pezzi di reticella di nylon di 10 x 10 cm, con maglia di 1-2 mm, chiusi con un filo di nylon per formare sacchetti sferici aventi diametro di 3-4 cm;

13b) in ciascun sacchetto viene posta una quantità di muschio pari a 400 mg; il materiale non deve venir compresso nel sacchetto, per consentire una circolazione d'aria anche nelle parti centrali del campione.

Esposizione dei moss-bags

14) I moss-bags vanno collocati ad un'altezza di 1,5 - 2 m dal suolo. Essi vengono fissati tramite filo di nylon direttamente ai rami di alberi isolati o su supporti adeguati, evitando la prossimità di edifici, boscaglie e siepi fitte. Si deve inoltre evitare di posizionare i campioni in prossimità di strade, a meno che non sia previsto un monitoraggio specifico di tali aree. Può essere utile collocare un campione di controllo anche nella stazione di raccolta del materiale. Se il supporto per i moss-bags è costituito da alberi, il campione va attaccato sui rami più esterni di alberi possibilmente isolati, evitando le zone ad elevata densità fogliare. Alternativamente, è possibile rimuovere la copertura fogliare sovrastante; durante la stagione invernale sono quindi da preferirsi le latifoglie. I sacchetti devono venir collocati in posizioni distanti dal tronco e dai rami principali. Va inoltre garantita una distanza di 5-10 cm dal ramo periferico su cui sono appesi.

15) Bisogna evitare di esporre i moss bags durante periodi con forti precipitazioni temporalesche.

16) Prima dell'esposizione, ogni moss-bag va accuratamente bagnato con acqua deionizzata.

17) In ciascuna stazione di campionamento è bene esporre almeno 3 moss bags per ridurre possibili effetti di disturbo determinati da variazioni a piccola scala nelle concentrazioni di metalli in traccia (si veda quanto detto al punto 3.3).

18) La collocazione dei moss-bags deve avvenire nel più breve tempo possibile (1-3 giorni). Il periodo di esposizione dei moss-bags va da un minimo di 4 ad un massimo di 9 settimane. La raccolta dei campioni deve seguire la stessa sequenza temporale della collocazione, affinché ogni moss bag rimanga esposto per lo stesso periodo di tempo.

Preparazione dei campioni

19) Le analisi vanno effettuate su tutto il materiale incluso nel moss bag. Le fasi di preparazione e analisi seguono le procedure indicate per il trattamento dei campioni di muschio autoctono.

5. ANALISI CHIMICA

Il materiale preparato secondo le metodiche descritte nei capitoli 3 e 4 va seccato a 45 °C per 48 hr. Un sottocampione va seccato a 105 °C per valutare la perdita d' acqua e potere in seguito riferire le concentrazioni degli elementi in traccia al peso secco.

I tessuti seccati a 45 °C vanno poi macinati in un mulino con corpo in agata. La granulometria del macinato deve essere inferiore a 125 m m. Circa 500 mg del campione così macinato vanno accuratamente pesati con una bilancia analitica.

Al campione macinato vanno aggiunti 7 ml HNO₃ e 3 ml H₂O₂. Si procede successivamente alla mineralizzazione (solubilizzazione) in forno a microonde con le seguenti condizioni operative:

Potenza(W)	Tempo (minuti)
250	1
250	2
250	5
400	5
600	5
Ventilazione	2

Al termine del trattamento di mineralizzazione il campione va raffreddato in bagno ad acqua, aperto con cautela per evitare il rilascio di vapori acidi. La soluzione va portata a volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

I metalli in traccia nella soluzione così ottenuta possono essere determinati con le seguenti tecniche analitiche:

- AAS fiamma;
- AAS con fornetto in grafite;
- AAS solido/liquido per la determinazione di Hg;
- ICP-MS;
- FRX.

Una prova in bianco deve essere preparata trattando le stesse quantità di reagenti utilizzati per i campioni secondo la procedura sopra descritta. E' necessario assicurare che tutte le operazioni di laboratorio siano effettuate usando vetreria di classe A, adottando le tecniche adeguate a limitare possibili contaminazioni del materiale da analizzare.

La verifica dell'accuratezza dei dati analitici va effettuata mediante l'analisi di almeno tre aliquote di materiale certificato standard. E' raccomandabile acquisire gli standard presso le seguenti istituzioni:

- CRM (Certified Reference Material);
- NBS (National Bureau of Standards).

E' per altro possibile fare riferimento ad altre organizzazioni, purché riconosciute a livello internazionale.

6. ELABORAZIONE E PRESENTAZIONE DEI DATI

- 1) I valori di concentrazione dei metalli in traccia vanno sottoposti ad analisi statistica. Sono particolarmente indicate tecniche di analisi multivariata di ordinamento (PCA, DCA, CCA, multidimensional scaling, RDA) diretti a individuare correlazioni positive o negative tra i vari metalli che possono riflettere patterns corrispondenti, o contrastanti, di deposizione.
- 2) Ai fini di valutare l'entità dell'apporto terrigeno può essere opportuno determinare la regressione fra le concentrazioni di vari metalli e quelle di Al, la cui origine è pressoché totalmente dovuta ad apporto terrigeno.
- 3) Nel caso di indagini a scala regionale o sovraregionale è opportuno indicare aree di riferimento non soggette a fonti locali di inquinamento al fine di definire i livelli di concentrazione di fondo dei vari metalli.
- 4) I dati di concentrazione vanno sintetizzati in mappe da produrre utilizzando opportuni software di cartografia computerizzata.

Bibliografia

- Castello M. (1996). Monitoring of airborne metal pollution by moss bags: a methodological study. *Studia Geobotanica*, 15: 91-103.
- Goodman G.T., Roberts T.M. (1971). Plants and soils as indicators of metals in the air. *Nature*, 231: 287-292.
- Rühling Å (ed.) (1994). Atmospheric heavy metal deposition in Europe - estimation based on moss analysis. *NORD*, 1994 (9): 1-53.
- Zechmeister H. (1997). Schwermetalldeposition in Österreich erfaßt durch Biomonitoring mit Moosen (Aufsammlung 1995). Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie, Wien.

L'UTILIZZO DI MUSCHI INDIGENI E TRAPIANTATI PER VALUTARE IN MICRO E MACRO AREE LE RICADUTE AL SUOLO DI ELEMENTI IN TRACCE: PROPOSTE METODOLOGICHE

Roberto Michele Cenci

*Centro Comune di Ricerca, Istituto dell'Ambiente, Ispra (Varese)
tel. 0332-789771; fax 0332-789831; E-mail: roberto.cenci@jrc.it*

Riassunto

L'utilizzo dei suoli per valutare l'inquinamento di un'area dovrebbe precedere ogni altro tipo di indagine analitica, ma la composizione geochimica delle rocce potrebbe portare a conclusioni errate. Il solo controllo dei suoli non è quindi un metodo sufficiente. Le caratteristiche morfologiche dei muschi permettono invece di ottenere risultati minimizzando le pressioni che derivano dall'ambiente. Infatti con un dispendio economico modesto, in confronto ad altre tecniche, si può ottenere, attraverso la misura della concentrazione dei metalli nei muschi, il tasso di deposizione e la ricostruzione dell'andamento della concentrazione nel tempo in aree geograficamente di diversa estensione.

Abstract

The analysis of soils for the evaluation of the contamination level of an area is very important; however, the geological rock composition should be taken into account to avoid wrong conclusions. Therefore the analysis of soils alone could be not sufficient. The use of mosses, due to their morfological characteristics, produces reliable results. In fact, in this way it is possible to determine, through the determination of heavy metals in mosses, their deposition rate and then reconstruct their variations in concentration either in small or in large areas. All can be done at a very low cost when compared to the traditional techniques.

Parole chiave: bioindicatori, muschi, metalli pesanti, suoli

Key words: bioindicators, mosses, heavy metals, soils

Introduzione

L'ambiente che ci circonda è interessato da una molteplicità di inquinanti. Infatti oltre ai tradizionali inquinanti atmosferici, quali CO, CO₂, SO₂, O₃ e NO_x, esiste un numero incalcolabile di altre sostanze di origine antropica in forma solida, liquida e gassosa. Esse sono in costante aumento e acquisiscono un'importanza sempre maggiore; tra queste, sono di grande rilevanza i metalli pesanti, che distribuiti in vari comparti ambientali sia biotici che abiotici possono provocare seri problemi ai vegetali, agli

animali e all'uomo. Infatti il loro accumulo nei differenti comparti può avere conseguenze imprevedibili e difficilmente calcolabili (Herpin & Berlekamp, 1996).

Uno studio sull'immissione di metalli nei vari comparti ambientali mostra che le attività umane giocano un ruolo decisivo nel ciclo globale di questi elementi. Tra le fonti principali di immissione si ricordano i fumi emessi dalle industrie, dalle centrali energetiche, dagli impianti di riscaldamento domestico e dai veicoli a motore (Nriagu & Pacyna, 1988).

Oltre ai livelli di inquinamento riscontrati nelle aree densamente popolate e industrializzate, è necessario considerare la dispersione dei metalli nell'atmosfera e il loro trasporto oltre i confini nazionali, con la possibilità di raggiungere aree remote, prive di una pressione antropica diretta.

Si è quindi resa necessaria la ricerca di nuovi strumenti per il controllo dell'inquinamento atmosferico.

I suoli

L'analisi del suolo è tuttora prioritaria per valutare l'inquinamento da metalli di un'area, inoltre permette la valutazione dei fattori di arricchimento per una più adeguata interpretazione dei risultati ottenuti utilizzando i muschi quali bioindicatori.

Il suolo è un comparto in continua evoluzione, poichè viene profondamente influenzato dalle condizioni del clima, dal tipo di rilievo, dalla vegetazione e dalle attività dell'uomo. Per "suolo" si intende quella coltre superficiale che, dopo un lungo periodo di anni, si è trasformata in strati differenziati detti orizzonti (Stralher, 1984).

Un suolo è costituito da particelle minerali e organiche; il materiale minerale deriva dall'alterazione delle rocce da parte degli agenti atmosferici, producendo frammenti di diverse dimensioni. La sostanza organica, invece, è costituita da organismi animali e vegetali e dai loro prodotti di trasformazione.

Un esempio di profilo dei suoli, nella concezione più generale, è rappresentato da quattro orizzonti. Gli orizzonti più superficiali, A e B, rappresentano il suolo in senso stretto; sono quelli più ricchi di sostanza organica nei quali si svolge la maggior parte dei processi biologici; l'orizzonte C è situato in profondità e corrisponde alla roccia madre alterata; l'orizzonte D è il substrato roccioso. Negli orizzonti A e B si possono differenziare dei suborizzonti determinati da agenti o fattori pedogenetici, che intervengono nello sviluppo di un suolo.

I principali fattori pedogenetici sono:

- Il clima;
- Il tipo di roccia madre;
- Il tipo di rilievo;
- La durata della pedogenesi;
- Le attività biologiche.

Il limite fondamentale dell'indagine attraverso i suoli è che i risultati sono condizionati dalla composizione geologica delle rocce e potrebbero essere erroneamente interpretati. Così, alte concentrazioni di un elemento potrebbero essere attribuite a contaminazione di origine antropica, mentre potrebbero dipendere dalla natura geochemica del territorio.

La sola analisi dei suoli non è quindi un metodo sufficiente per determinare con sicurezza il grado di contaminazione di un'area.

Il biomonitoraggio

Informazioni più dettagliate e complete sugli effetti dell'inquinamento atmosferico si possono ottenere attraverso le analisi chimico-fisiche dirette dell'aria affiancate da tests biologici.

In anni recenti i ricercatori, in particolare quelli nordeuropei, hanno considerato dei metodi che rendessero possibile valutare la deposizione dei metalli pesanti e registrarne il loro accumulo nei sistemi biologici, per ottenere una corretta informazione su larga scala e a costi contenuti. La Figura 1 mostra un esempio di siti di campionamento di muschio dove appare evidente la quasi totale esclusione delle nazioni che si affacciano sul mare Mediterraneo (Rühling, 1994).

Si è così introdotto il concetto di "biomonitoraggio", cioè il monitoraggio dell'inquinamento effettuato mediante organismi viventi. Il controllo si basa sul principio che una sostanza tossica è rilevata dagli organismi viventi, i quali sono in grado di indicarne la presenza e, in prima approssimazione, la quantità nell'ambiente.

In generale, ogni organismo vivente possiede una risposta ai diversi fattori ecologici, sia naturali che antropici, e poichè l'inquinamento atmosferico determina delle variazioni nell'ambiente interessato, queste si riflettono sugli organismi viventi (Manning & Feder, 1980).

Gli organismi biologici pertanto possono essere impiegati nel monitoraggio dell'inquinamento atmosferico sia come bioindicatori che come bioaccumulatori. Nel primo caso viene utilizzata la loro sensibilità ai contaminanti atmosferici, che permette una stima della qualità dell'aria della zona indagata (metodo indiretto). Nelle specie più sensibili agli inquinanti i sintomi principali presi in considerazione sono:

- Modificazioni morfologiche;
- Variazioni della vitalità (modificazioni fisiologiche);
- Danni genetici.

Un buon bioindicatore dovrebbe inoltre possedere le seguenti caratteristiche:

- Sensibilità nota a determinate sostanze inquinanti;
- Ampia distribuzione nell'area indagata;
- Scarsa mobilità;
- Lungo ciclo vitale;
- Uniformità genetica nella zona sottoposta ad indagine.

Nel caso del bioaccumulo viene sfruttato il principio opposto a quello della bioindicazione, vengono cioè ricercate quelle specie maggiormente resistenti all'inquinamento atmosferico, in grado di accumulare per lungo tempo notevoli quantità di contaminanti, quali i metalli pesanti, i composti organici, i radionuclidi quantificati (metodo diretto). Un organismo quindi è adatto ad essere utilizzato come bioaccumulatore se presenta determinate caratteristiche, in particolare:

- Alta tolleranza per gli inquinanti indagati; punto essenziale per evidenziare le punte massime di inquinamento in quanto un organismo non in grado di sopravvivere ad alte concentrazioni di un inquinante non è adatto al ruolo di bioaccumulatore;
- Capacità di accumulare le sostanze esaminate possibilmente in correlazione lineare tra la concentrazione dei contaminanti nell'ambiente e quella nell'organismo;
- Ampia distribuzione nell'area indagata;
- Nessuna o ridotta capacità di assorbire sostanze dal substrato.

Le due strategie si possono considerare come complementari, in quanto permettono di ottenere informazioni sull' inquinamento che garantiscono un efficace biomonitoraggio integrato.

Tra gli organismi più usati come bioaccumulatori vi sono le briofite, di cui fanno parte i muschi.

Le briofite

Le briofite sono organismi eucarioti, autotrofi, a vita prevalentemente terrestre, tassonomicamente suddivise in Musci ed Hepaticae.

Tutte presentano la caratteristica di formare un embrione (tanto primitivo che da alcuni non è riconosciuto come tale) e di possedere alternanza di generazioni antitetiche ed eteromorfe, con prevalenza del gametofito (generazione aploide) sullo sporofito (generazione diploide), mai autonomo poiché dipende dal gametofito per il nutrimento.

Le briofite sono le più semplici piante fotosintetizzanti capaci di vivere stabilmente sulla terraferma.

La loro emersione dall'acqua, nonostante il pericolo dell'eccessiva perdita di quest'ultima attraverso la superficie della pianta, ad opera del processo di traspirazione, offre due vantaggi:

- 1) avere un rapido ricambio di CO₂ dall'ambiente;
- 2) assorbire la luce non più filtrata dall'acqua ed impoverita dei raggi che sono preferenzialmente assorbiti dai pigmenti fotosintetici.

La conquista dell'ambiente terrestre ha implicato alcune modifiche nel loro processo di riproduzione. Per quanto riguarda la riproduzione sessuale, le briofite sono ancora simili alle alghe, in quanto producono gameti maschili mobili per la presenza di flagelli; perchè possa avvenire la fecondazione è necessaria la presenza di acqua o rugiada, affinché i gameti maschili possano raggiungere quelli femminili. Lo spostamento dei gameti, dipendente dall'acqua, può avvenire sulla terraferma solo a distanze limitate.

Per quanto riguarda la riproduzione per sporogonia, invece, le briofite presentano caratteri da piante terrestri in quanto producono meiospore che vengono trasportate dal vento, prive di flagelli e delimitate da pareti rigide che le proteggono dalla perdita d'acqua.

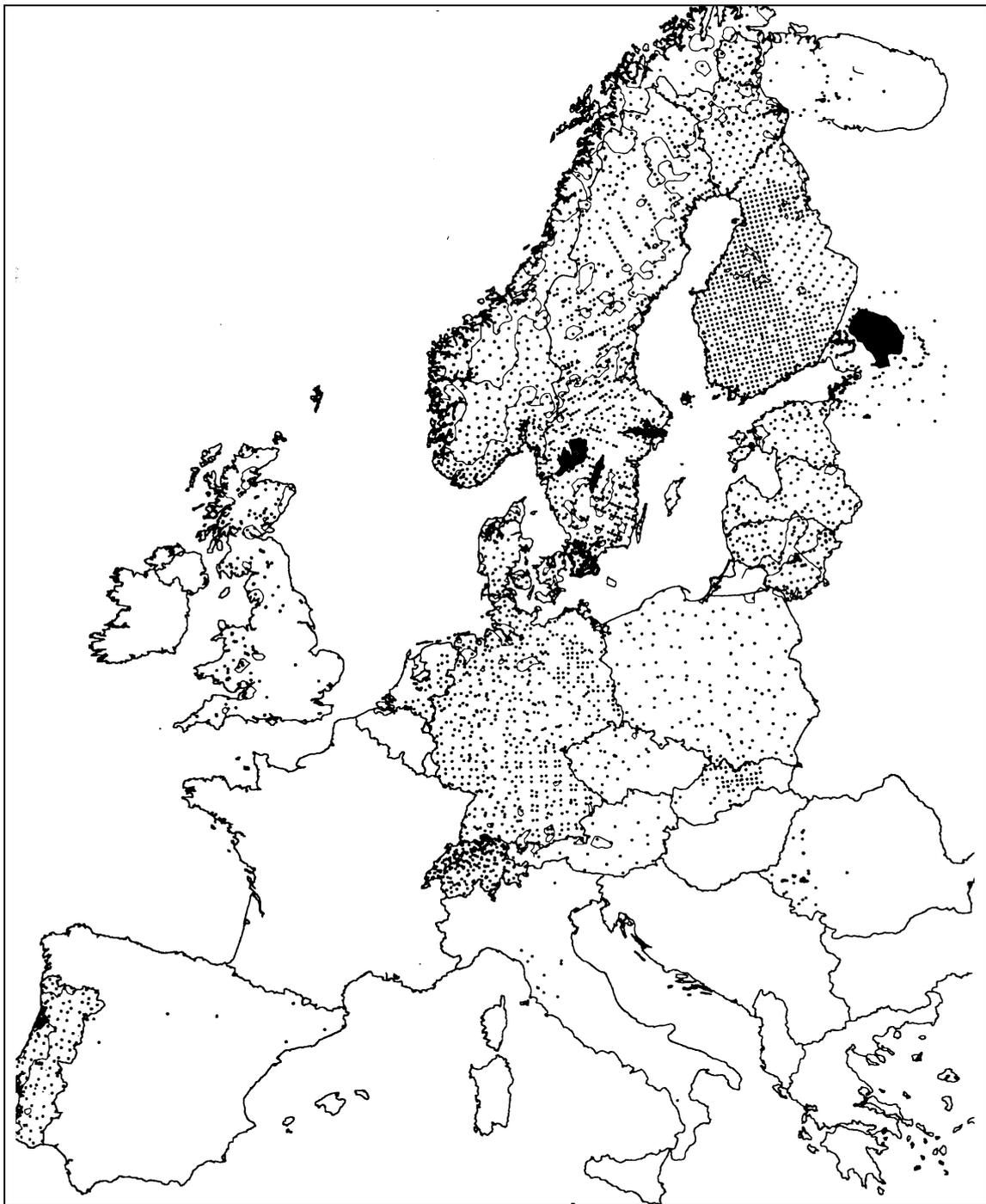


Figura 1. Mappa europea dei siti di campionamento di muschio (Rühling, 1994)

Morfologia delle briofite

Il gametofito

Quando la meiospora germina dà origine a un sottile filamento detto protonema, su cui spuntano delle gemme che danno origine al gametofito; esso, giunto a maturità sessuale, differenzia i gameti.

Generalmente nei muschi il gametofito è costituito da una porzione allungata, detta fusticino, da cui si dipartono delle appendici laterali appiattite, le foglioline, e da una parte basale costituita da cellule ialine, prive di cloroplasti, i rizoidi, con funzione di ancoraggio al substrato.

Il fusticino può raggiungere lunghezze di alcuni decimetri, può essere semplice o ramificato. Di frequente numerosi gametofiti sono riuniti in un gran numero a formare un "cuscinetto" che ricopre estese superfici di terreno nei boschi.

Lo sporofito

Lo sporofito è completamente differente. Innanzitutto vive sempre attaccato al gametofito, dal quale riceve le sostanze nutritive.

In generale, esso è costituito da un piede, che affonda nella parte superiore del fusticino e si prolunga nella seta, che è una porzione filamentosa priva di appendici laterali e che termina alla sommità con una capsula, nella quale sono contenute le meiospore. A maturità raggiunta, la capsula si apre liberando le spore, che vengono disperse dal vento.

Ecologia delle briofite

Le briofite sono organismi fotosintetizzanti che vivono in ambiente subaereo e, solo in pochi casi, in acqua dolce.

Sono ampiamente distribuite in una grande varietà di habitat, in parte sul terreno, sui sassi e sulle rocce, sulle foglie, sui tronchi e sui rami degli alberi.

I muschi sono molto importanti dal punto di vista ecologico, in quanto possiedono delle esigenze limitate, cosicchè possono insediarsi in ambienti da colonizzare, dove la maggior parte degli organismi non è in grado di sopravvivere.

La presenza di muschi sul terreno costituisce un fattore di primaria importanza nell'assorbimento dell'acqua piovana, con il duplice risultato di ridurre o eliminare il pericolo del ruscellamento, e di cedere progressivamente l'acqua trattenuta al terreno (Gerola, 1988).

I muschi non posseggono nè tessuti di conduzione legnosi nè tessuti di sostegno lignificati, di conseguenza l'assorbimento dell'acqua avviene attraverso tutta la loro superficie.

Le briofite in disidratazione non muoiono, ma entrano in quiescenza e, se nuovamente bagnate, ritornano a svolgere le loro funzioni vitali.

Utilizzo delle briofite come indicatori ambientali

Alla fine degli anni '60, scienziati svedesi utilizzarono i muschi per valutare l'inquinamento da metalli pesanti in Scandinavia (Rühling & Tyler, 1970). Dopo di allora, l'uso di tali organismi per scopi di monitoraggio ambientale si è sistematicamente

esteso (Knight *et al.*, 1961; Clymo, 1963; Rühling & Tyler, 1969; Goodman & Roberts, 1971; Little & Martin, 1974; Rasmussen & Johnsen, 1976; Pilegaard, 1979; Brown, 1984; Markert & Weckert, 1989; Burton, 1990; Cenci & Muntau, 1993; Cenci, 1993; Goltsova & Vasina, 1993; Bargagli *et al.*, 1994; Cenci *et al.*, 1995; Berg & Steinnes, 1997; Cenci & Palmieri, 1997; Herpin *et al.*, 1997; Berlekamp *et al.*, 1998; Cenci *et al.*, 1998; Zechmeister, 1998).

La maggioranza dei muschi ricava i nutrienti necessari direttamente dall'atmosfera, non avendo sviluppato un vero e proprio apparato radicale o un tessuto di conduzione per l'acqua. I metalli pesanti sono perciò assunti attraverso la superficie delle foglioline; ciò significa che la concentrazione di tali elementi nei muschi può essere strettamente correlata alla deposizione atmosferica, in quanto i processi di assorbimento dal substrato possono essere esclusi.

Le principali caratteristiche che rendono le briofite adatte ad essere utilizzate come indicatori per la deposizione dei metalli pesanti atmosferici, possono essere così riassunte:

- Sono generalmente prive di una cuticola protettiva e di una spessa parete cellulare; ciò rende i loro tessuti facilmente permeabili all'acqua e ai minerali, inclusi gli ioni metallici.
- I loro tessuti (costituenti la parete cellulare) hanno numerosi siti attivi (gruppi carichi negativamente) che agiscono come efficienti scambiatori cationici. E' lecito supporre la presenza di gruppi con particolare affinità per i cationi metallici (agenti chelanti) (Brown, 1982; Rao, 1982).
- Il loro rifornimento minerale è ottenuto principalmente dalle deposizioni di particelle e di sali solubili. Il substrato riveste poca o nessuna importanza nell'apporto di minerali. Esistono però delle eccezioni: in quanto in alcuni muschi sembra esservi un assorbimento di metalli dal suolo, principalmente per mezzo della risalita capillare di acqua; specie quindi non adatte per il biomonitoraggio.
- La formazione di nuova biomassa, per altro scarsa, avviene sulla sommità di quella vecchia, precludendo qualsiasi contatto o interazione con il suolo o il substrato.
- In certe specie di muschi come l'*Hylocomium splendens* (Hedw) B.S.G. e nel genere *Sphagnum*, è possibile riconoscere e separare gli incrementi annuali di crescita, facilitando la determinazione dell'età e il tempo di esposizione del materiale usato.
- Ad eccezione di alcune specie, non sembra esservi alcuna traslocazione di metalli pesanti tra segmenti adiacenti o dalla vecchia biomassa a quella in via di sviluppo.
- Molte specie sono largamente diffuse (cosmopolite o circumpolari) in determinati habitat.
- Grazie alla loro longevità, a seconda della specie e del metodo di campionamento, le briofite possono essere utilizzate per valutare le deposizioni durante più anni.

I principali limiti delle briofite come indicatori sono:

- Le specie più adatte per valutare le deposizioni sono spesso assenti nelle aree urbane in quanto sensibili alle alte concentrazioni di SO₂ nell'aria. E' quindi necessario usare taxa molto tolleranti.
- In concomitanza con situazioni ambientali particolari (per esempio deposizioni acide) potrebbe verificarsi un assorbimento incompleto di alcuni metalli (principalmente Zn e Cd), caratterizzati da un'affinità ridotta per gli scambiatori cationici del tessuto.

- La scelta dei punti di campionamento può essere determinante e forse più critica che nel caso di altre metodologie.

Va ricordato infine che in numerosi studi, tendenti a valutare la deposizione dei metalli atmosferici, sono state utilizzate briofite trapiantate.

Così Goodman & Roberts (1971) introdussero, in un'area industriale del Galles, dei ceppi recanti muschio della specie *Hypnum cupressiforme* Hedw. Il trapianto morì dopo alcune settimane, ma i muschi continuarono ad accumulare metalli.

Quindi nel caso dei muschi trapiantati il problema principale sembra essere l'introduzione in habitat nei quali non possono sopravvivere per le condizioni climatiche avverse o di severa contaminazione. Infatti parecchie specie comunemente usate sono sensibili all'essiccazione e spesso interrompono la crescita o muoiono in un habitat inospitale.

Localizzazione dei metalli nelle briofite

E' noto che il tessuto delle briofite è uno scambiatore di ioni (Anschütz & Gessner, 1954; Puustjärvi, 1955). L'efficienza di ritenzione decresce nell'ordine: $Fe^{3+} > Mg^{2+}$, $Ca^{2+} > K^+$, Na^+ a concentrazione ambiente come dimostrato per lo *Sphagnum* da Bell (1959). Per gli ioni dei metalli pesanti invece l'efficienza di ritenzione varia nell'ordine: Cu^{2+} , $Pb^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$, Mn^{2+} in base agli studi condotti da Rühling & Tyler (1970). L'ordine è valido per un grande intervallo di concentrazioni, sia per gli ioni singoli che in soluzione mista. Il rifornimento dei nutrienti minerali e dei metalli pesanti alle briofite può avvenire nei modi seguenti: 1) Specie che hanno una dipendenza quasi completa dalle deposizioni atmosferiche. Ciò è dovuto alla grande capacità di scambio, l'assenza di cuticola e la semplice organizzazione del tessuto che rendono le briofite incapaci di evitare l'assorbimento e l'adsorbimento di metalli pesanti dalle deposizioni atmosferiche. Presentano inoltre alto rapporto superficie/volume, o peso, che favorisce l'intrappolamento di particelle, sebbene la velocità del vento o altre caratteristiche del sito ne influenzano l'efficienza. 2) Specie di muschi che dipendono per il rifornimento di nutrienti oltre che dall'atmosfera anche dal substrato. In alcuni muschi viventi su terreni con alte concentrazioni di solubili, avviene un assorbimento di sali metallici dal substrato (Shimwell & Lauria, 1972). I sali sono apparentemente trasportati verso l'alto dalla risalita capillare di acqua, attraverso la biomassa. Essendo però in genere nei suoli il contenuto di metalli pesanti in soluzione molto basso, questo meccanismo può divenire irrilevante.

Rasmussen & Johnsen (1976), studiando l'assorbimento di minerali dell'epifita *Hypnum cupressiforme*, conclusero che la maggior parte del contenuto di metalli derivava dall'atmosfera e solo una piccola parte dal tronco dell'albero su cui il muschio viveva.

Tossicità

Sono stati eseguiti esperimenti per determinare la sensibilità delle briofite ai metalli, forniti principalmente sotto forma di sali.

Per la valutazione degli effetti tossici sono stati considerati alcuni parametri quali decrementi nel tasso di crescita, cambiamenti nel contenuto di clorofilla, variazioni nel tasso di fotosintesi e respirazione.

Dalle risultanze dei diversi studi, si può concludere che la tossicità relativa dei metalli pesanti a eguali concentrazioni degli ioni bivalenti più comuni decresce nel seguente ordine: Hg > Cu, Cd > Pb > Zn. La posizione del piombo, all'interno di questa serie, riflette probabilmente l'elevata affinità di questo ione per le cariche negative nella parete cellulare.

Metodiche per l'utilizzo dei muschi

Si passerà ora alla presentazione delle proposte metodologiche per l'utilizzo dei muschi come bioaccumulatori:

(A) muschi indigeni

(B) muschi trapiantati

Generalità

Il principale limite nell'utilizzo dei muschi indigeni e trapiantati come bioaccumulatori di metalli pesanti e metalloidi consiste nel fatto che si tratta di un sistema biologico.

A tale limite si contrappone una serie notevole di vantaggi:

- ◆ bassi costi di gestione se raffrontati a tecniche "tradizionali"
- ◆ rapidità nell'ottenimento delle informazioni e dei risultati per un più rapido intervento
- ◆ possibilità di impiego sia su vaste aree sia su aree ridotte
- ◆ possibilità di intervento in quelle aree prive di muschi
- ◆ semplicità nelle procedure di dissoluzione e di analisi
- ◆ possibilità di ricostruire la storia passata delle deposizioni di elementi in tracce
- ◆ possibilità di valutare nel tempo le deposizioni
- ◆ ottenimento del tasso di deposizione annuo ($\text{mg m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$) mediante i valori di concentrazione.

Strategie di campionamento

Nel pianificare le strategie di intervento occorre porre attenzione alla scala territoriale di campionamento per una corretta scelta dell'area e del numero di punti di raccolta e/o posizionamento del muschio. Informazioni relative alla variabilità del fenomeno, in considerazione delle modalità di dispersione, deposizione al suolo, influenzano la densità per unità di superficie dei campionamenti. Per fonti puntiformi quali ad esempio fonderie, termodistruttori, centrali elettriche ecc., si potrà utilizzare un campionamento/posizionamento di muschi su circonferenze concentriche all'impianto diradando il numero delle stazioni con la distanza dall'impianto; raggi di 0.2, 0.5, 1, 3, 8, e 15 km possono essere adeguati. In contrapposizione, sarà da ritenersi sufficiente per aree che misurano centinaia di migliaia di km^2 (esempio il territorio italiano) il campionamento/posizionamento di muschi effettuato ai vertici di una griglia avente lato 20-30 km. Per casi particolari ci si può servire di transetti, mentre in centri abitati quali paesi o città si opterà per un posizionamento dei muschi che segue l'andamento delle

strade o una griglia a seconda degli elementi da ricercare.

L'utilizzo di un campionamento di tipo sistematico permette il confronto con altri studi; a tale proposito si può utilizzare la cartografia IGM, Tavole a scala 1:100.000, oppure i Fogli 1:25.000 che presentano quadrati aventi lato di 1 km, le coordinate delle stazioni potrebbero venire posizionate sull'intersezione dei punti dei reticoli. Un'altra possibilità viene fornita dalle carte dell'Inventario Nazionale Forestale che presentano reticoli aventi maglie di passo 3 km. A seconda del tipo di informazione che si vuole ottenere si sceglierà una maglia adeguata.

Elaborazione statistica dei risultati e Coefficiente di Variazione

Il Coefficiente di Variazione (CV%) intra-area, che riassume tutti gli errori compiuti dal momento del campionamento all'analisi, deve venire stimato dal ricercatore utilizzando una tra le stazioni indagate, oppure, in via approssimativa, si potranno utilizzare i risultati della Tabella 1. Esso serve a capire se una variazione di concentrazione degli elementi è imputabile a deposizioni avvenute o alla variabilità di concentrazione che si riscontra in una medesima stazione o area di campionamento. Il CV% deve venire valutato sia quando si intende utilizzare i muschi indigeni sia per l'impiego dei muschi trapiantati. Occorre procedere al campionamento nel modo seguente: cercare un'area ricca di muschio che formi un compatto cuscinetto e delimitare con un filo di nylon un quadrato avente lato 1 metro, suddividerlo in 9 sotto-quadrati con lato pari a 33 cm. In ciascuno dei 9 sotto-quadrati raccogliere i tessuti apicali di una medesima lunghezza (es. 3 cm). (Per la raccolta e i trattamenti seguire come descritto in Muschio indigeno). Dalle soluzioni ottenute occorre effettuare 5 volte la ripetizione dell'analisi per ogni elemento per ricavare, oltre al valore medio, il coefficiente di variazione per cento.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
CV %	19.8	11.7	32.1	12.6	18.4	22	6.8	22.7	11.1	20.8	17.4	20.4

Tabella 1. Coefficienti di Variazione di alcuni elementi ottenuti nel reticolo raccolto in una località della provincia di La Spezia (l'elevato valore ottenuto per l'elemento Cr è presumibilmente imputabile al processo di mineralizzazione)

La determinazione del CV permette inoltre di eseguire una mappatura delle sottoaree caratterizzate da muschi a simile concentrazione. A tale scopo i risultati delle stazioni dell'intera area indagata vengono suddivise in classi, la cui ampiezza deve essere determinata in modo statisticamente significativo.

Utilizzando un semplice test, fissato il livello di confidenza ($\alpha = 5\%$ o 10%), l'ampiezza della singola classe (Δ) si determina attraverso la formula:

$$\Delta = t_{\alpha, n-1} \cdot \mu \cdot CV \cdot n^{-1/2}$$

dove:

n è il numero dei dati,

μ è la media dei dati,
CV è il coefficiente di variazione intra-area non espresso in percentuale,
 $t_{\alpha, n-1}$ è il valore del quantile della t-student con probabilità α .

Muschio indigeno (A)

Il muschio indigeno rappresenta la “memoria passata” delle deposizioni di metalli pesanti avvenute nell’arco di tempo compreso tra il momento della raccolta sino a un periodo antecedente di 10-15 anni a seconda della lunghezza del tallo che viene prelevata. Permette quindi di ricostruire in parte le vicissitudini e la storia di grandi aree (migliaia di km²) e/o ridotte aree (pochi km²).

A1) L’area di raccolta del muschio deve distare almeno 200 metri da abitazioni e da strade ad elevata percorrenza.

A2) L’area di raccolta del muschio può avere una superficie massima di 50 m² per quelle zone con ridotta presenza di muschio, in caso di tappeti compatti e abbondanti in muschio l’area potrà essere uguale o inferiore a 1m².

A3) Per ciascun punto di campionamento raccogliere una quantità di muschio fresco compresa tra 20 e 50 g di *Hypnum cupressiforme* (in caso di assenza di *H.c.* raccogliere un’altra sola specie preferibilmente la più abbondante) esempio *Hylocomium splendens* (Hedw.), *Scleropodium purum* (Hedw.) utilizzando guanti in lattice. La scelta di *H.c.* viene effettuata sulla base di numerose osservazioni tra le quali un’abbondante presenza sul territorio europeo, un largo utilizzo e un bioaccumulo più pronunciato.

A3a) privilegiare i muschi che stanno all’interno del tappeto al fine di minimizzare l’effetto suolo (aumento della concentrazione di metalli in tracce nei muschi dovuto al suolo).

A3b) durante la raccolta occorre effettuare una prima pulitura, eliminando foglie, terriccio, ramoscelli, aghi di conifere ed altro.

A3c) il muschio va riposto in una busta preparata con carta da filtro, sulla busta vanno scritte tutte le informazioni necessarie al riconoscimento (numero stazione, località, data di prelievo, ecc.).

A4) In laboratorio togliere dalla busta i muschi.

A4a) appoggiarli su di un banco con piano in PVC oppure in ceramica.

A4b) munirsi di guanti in lattice nuovi o lavati con acqua ad Elevata Purezza (EP) o Bi-Distillata (BD).

A4c) tagliare con una forbice in materiale plastico o strappare con le mani i primi 2, 3, 4 o 5 cm apicali per una massa fresca pari a circa 10-20 g, privilegiando i talli più verdi.

A4d) deporli in un cristallizzatore (contenitore con base diametro 20 cm e altezza 10 cm) in vetro classe A, lavato in precedenza con acqua EP o BD; in mancanza di un cristallizzatore utilizzare un bicchiere in vetro da laboratorio classe A.

A4e) coprire il cristallizzatore con un vetro di orologio.

A5) Porre il tutto in una stufa per 48 ore alla temperatura di 45°C. La temperatura di 45°C minimizza le perdite per volatilizzazione di elementi quali Hg, Pb, ecc.

A5a) una medesima quantità di muschio deve essere essiccata alla temperatura di 105 °C, al fine di valutare la perdita in acqua.

A6) Solo la massa di muschio essiccata a 45 °C deve essere macinata con mulino con corpo e sfere in agata, in mancanza di mulino si può utilizzare un mortaio in agata. La granulometria del macinato deve essere inferiore a 125 µm. Tale misura di granulometria assicura un buon livello di omogeneità del campione per pesate pari a 100-200 mg.

A7) Riporre il muschio macinato in un recipiente in polietilene con doppio tappo, precedentemente lavato.

A7a) introdurre nel recipiente una sfera in teflon o vetro avente diametro di 10 mm, che servirà per omogeneizzare il campione macinato prima di ogni pesata.

Trapianto di muschi (B)

Il muschio trapiantato può essere inteso come la “memoria presente”, in quanto fornisce indicazioni che riguardano le deposizioni avvenute dal momento del trapianto sino al periodo di raccolta, il quale non potrà superare i 2 anni di esposizione. Risulta fondamentale trovare un’area intensamente coperta di muschio, (che servirà per raccogliere i muschi da trapiantare), la cui concentrazione in metalli pesanti sia la più bassa possibile per facilitare la valutazione nel tempo delle deposizioni. Trovata l’area procedere nel modo seguente:

B1) Raccolta in modo casuale di muschi su tutta l’area (circa 100 g) che serviranno a valutare, in modo approssimato, il livello di concentrazione degli elementi di interesse.

B2) Accertato, dopo analisi in laboratorio, che le concentrazioni degli elementi sono paragonabili ai valori base o inferiori ai valori medi italiani (Tabella 2) si potrà passare alla raccolta (punto B3), oppure cercare un’altra area e ripetere le operazioni dei punti B1 e B2.

B3) Utilizzando una vanga ben affilata, tagliare il muschio e il suolo sottostante per 10-15 cm di profondità per un’area di circa 35 x 45 cm.

B3a) sollevare muschio e suolo assieme e depositare il tutto in una cassetta di plastica precedentemente lavata con acqua BD o EP, (le cassette forate della frutta sono adatte al caso).

B3b) procedere nello stesso modo per le successive raccolte.

B4) Nell’area dove si procederà al posizionamento del muschio occorre preparare una buca con le stesse dimensioni della cassetta.

B4a) depositare la cassetta nella buca dove il tappeto di muschio dovrà risultare, una volta posizionato, allo stesso livello del terreno circostante.

B4b) occorre fare attenzione di non lasciare suolo scoperto a contatto con il muschio, coprire accuratamente i bordi esterni con erba per minimizzare l'effetto suolo.

B5) Il posizionamento delle cassette di muschio deve essere effettuato nelle vicinanze di una zona d'ombra, in assenza di aree pianeggianti privilegiare il pendio a Nord. In mancanza di ombra si potrà costruire un riparo verticalmente al piano dei muschi con materiale privo di metalli (ad esempio con canne di bambù o teli verdi a maglie in materiale plastico), al fine di ottenere una zona d'ombra il più possibile completa sul muschio. In tale operazione occorre cercare di non ostacolare la circolazione laterale dell'aria.

B6) Dopo aver depositato la cassetta, procedere al campionamento dei muschi per definire il livello iniziale della concentrazione degli elementi che si vorrà indagare, utilizzare guanti in lattice e raccogliere su tutta la superficie circa 2 g di muschio (tessuti apicali da 2, 3, 4 o 5 cm di lunghezza) che verranno posti in una busta e portati in laboratorio e trattati come descritto in precedenza (da A4 sino ad A7a).

B7) Il muschio e il suolo ad esso sottostante vanno bagnati con acqua EP o BD. La cadenza e la quantità di acqua dipendono dalla stagione, occorre ricordarsi che il suolo sotto il tappeto di muschio deve rimanere sempre umido.

B8) Le raccolte successive dei muschi (circa 2 g) possono essere effettuate con cadenza di 2, 3, 4, 6, 12, 18 o 24 mesi a seconda dell'ambiente da indagare e dalle esigenze di lavoro.

B9) E' opportuno raccogliere, per una sola volta, nelle vicinanze di ciascuna stazione di muschi, un campione di suolo che verrà analizzato, al fine di una più completa interpretazione dei risultati (vedere in appendice le indicazioni).

Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
400	0.12	0.38	0.2	1.2	8	600	77	0.53	15	14	4.6	27

Tabella 2. Valori base di elementi presenti in *Hypnum cupressiforme* in aree italiane non contaminate (mg kg^{-1} peso secco)

Mineralizzazione acida in forno a microonde

- I campioni di muschio macinati vanno posti con il loro contenitore senza tappo in stufa alla temperatura di 45 °C quattro ore prima dell'operazione di pesata.
- Agitare il contenitore, tolto dalla stufa e tappato, per 3 minuti per omogeneizzare il macinato.
- Pesare direttamente nei contenitori in teflon 200-250 mg circa di muschio macinato con una bilancia analitica.

- Aggiungere 5 ml di HNO₃ e 2.5 ml di H₂O₂.
- Non aggiungere altri reattivi o acidi (es. HF).
- I contenitori vengono ermeticamente chiusi utilizzando una chiave dinamometrica e posti nel carosello all'interno del forno a microonde.
- Esempio di condizioni operative per campioni in legno, cellulosa, foglie, muschi e vegetali in genere:
 - 1 minuto alla potenza di 250 Watt
 - 2 minuti alla potenza di 0 Watt
 - 5 minuti alla potenza di 250 Watt
 - 5 minuti alla potenza di 400 Watt
 - 5 minuti alla potenza di 600 Watt
 - 2 minuti di ventilazione
- Terminato il programma termico i contenitori vengono lasciati raffreddare.
- I contenitori vengono aperti lavorando sotto cappa aspirante.
- La soluzione di ciascun contenitore viene quantitativamente trasferita con acqua EP o BD in matracci tarati da 25 o 50 ml.
- Per ogni 4 mineralizzazioni di campioni di muschio occorre trattare nello stesso modo 1 campione standard di riferimento e 1 bianco che sarà composto solamente dalle stesse quantità di reagenti utilizzati per i campioni secondo la procedura sopra descritta.
- Ciascuna soluzione (campioni di muschio, standard e bianchi) dovrà essere analizzata almeno 2 volte, fornendo successivamente il valore medio.

Strumentazione, reattivi e standard

La strumentazione necessaria è la seguente:

- Forno a microonde per la digestione acida dei muschi con potenza di 1200 W e frequenza di 2450 MHz. I contenitori per i campioni devono essere in TFM (Teflon).
- Vetreria di classe A.
- Strumentazione per la determinazione degli analiti in soluzione acquosa e/o solida, che garantisca una sensibilità adeguata alla rivelazione di quantità minime di analita che sono presenti nei muschi. Esempio di strumentazione:
 - ICP-MS
 - AAS con fornetto in grafite
 - AAS fiamma
 - AAS solido/liquido per la determinazione del Hg

Reattivi e soluzioni standard:

- HNO_3 67% (p/v) ad elevata purezza (es. Suprapur Merck)
- H_2O_2 30% (p/v) ad elevata purezza (es. Suprapur Merck)
- H_2O ad elevata purezza, tipo preparata con sistema Milli-Q. bidistillata
- Soluzioni standard multiple preparate a partire da soluzione standard disponibili in commercio (es. Merck Titrisol 1g/l)

Materiali certificati standard:

- NBS (National Bureau of Standards)
- CRM (Certified Reference Material)
- NIST (National Institute of Standardization)
- NRC-CNRC (National Research Council Canada)

Prelievo e trattamento campioni superficiali di suolo

(Dovranno venire considerati e quindi analizzati solamente quegli elementi di maggiore interesse)

L'analisi del suolo serve per valutare l' "effetto suolo" (aumento di concentrazione causato da particelle terrigene che dal suolo si depositano sulle foglioline dei muschi) per ottenere il Fattore di Arricchimento (F.A.) che si ottiene dal rapporto (Concentrazione Elemento nel muschio/Concentrazione di Al nel muschio, diviso Concentrazione Elemento nel suolo/Concentrazione Al nel suolo).

Il campionamento del suolo prevede l'asportazione di uno strato superficiale di 5 cm di profondità e 10 cm di lato, dopo aver asportato la lettiera.

- Dopo aver raccolto il suolo e posto in un cristallizzatore o contenitore in vetro, togliere manualmente tutto quanto è macroscopico (sassi, rami ecc.).
- Essiccare il suolo in stufa a 45°C per 48 ore.
- Setacciare utilizzando un setaccio avente maglie di 2 mm.
- Macinare la frazione inferiore o uguale a 2 mm con mulino e sfere di agata.
- Pesare circa 500 mg con bilancia analitica direttamente nei contenitori in teflon per digestione mediante microonde.
- Aggiungere 5 ml HNO_3 e 2,5 ml H_2O_2 .
- Scegliere un programma per suoli (viene qui riportato un esempio).

5 minuti alla potenza di 250 watt
5 minuti alla potenza di 400 watt
15 minuti alla potenza di 500 watt
2 minuti di ventilazione.

- Terminato il programma termico i contenitori vengono lasciati raffreddare.
- I contenitori vengono aperti sotto cappa aspirante.
- La soluzione di ciascun contenitore viene quantitativamente trasferita con acqua EP o BD in matracci da 25 o 50 ml.
- Per ogni 4 mineralizzazioni di campioni di suolo occorre trattare nello stesso modo 1 campione standard di riferimento e 1 bianco che sarà composto solamente dalle stesse quantità di reagenti utilizzati per i campioni secondo la procedura sopra descritta.
- Ciascuna soluzione (campioni di suolo, standard e bianchi) dovrà essere analizzata almeno 2 volte, fornendo successivamente il valore medio.

Elementi da analizzare

- Determinazione di carbonio totale, idrogeno e azoto, su campioni solidi, mediante analizzatore elementare CHN.
- Determinazione dei macro elementi.(Si, Al, Fe, P, K, Ca, Mn, Mg, Ti, e S).
- Determinazione degli elementi in traccia.(As, Cd, Pb, Cu, Cr, Ni, Zn, V, Se, Sb e Hg).

Materiali certificati standard

- NBS (National Bureau of Standards)
- CRM (Certified Reference Material)
- NIST (National Institute of Standardization)
- NRC-CNRC (National Research Council Canada)

Tecniche analitiche

- ICP-MS
- AAS con fornetto in grafite
- AAS fiamma
- AAS solido/liquido per la determinazione del Hg
- FRX

Conclusioni

Una discussione di tre esempi i cui risultati sono stati ottenuti seguendo le normative precedentemente presentate, viene qui illustrata e criticata con grafici. Sono stati scelti differenti elementi per un quadro conoscitivo più completo.

Il monitoraggio attraverso i suoli risulta utile per valutare in prima approssimazione l'inquinamento di un'area, ma non sempre è in grado di fornire conclusioni interpretabili in maniera univoca, in quanto vi sono fattori non dipendenti dall'inquinamento che condizionano i suoli. L'analisi dei suoli dovrebbe venire affiancata all'utilizzo dei muschi per valutare il Fattore di Arricchimento permettendo di interpretare e comprendere l'"effetto suolo" che può causare contaminazioni ai muschi.

L'utilizzo dei muschi indigeni ha fornito, a partire dagli anni sessanta, indicazioni alquanto positive in merito alle ricadute al suolo di metalli pesanti e metalloidi in vaste aree del centro e del nord dell'Europa. In Danimarca e in altre nazioni europee i muschi vengono utilizzati in modo sistematico per valutare le deposizioni al suolo.

In Italia solo negli ultimi anni sono state monitorate alcune aree, in altre si stanno effettuando controlli utilizzando i muschi. Difficoltà organizzative e scetticismo da parte di istituzioni e organi amministrativi sono alla base dello scarso successo ottenuto nel passato, un cambiamento di tendenza sta avvenendo da alcuni anni a questa parte.

Una esperienza positiva è stata effettuata nella provincia di La Spezia, dove sono stati utilizzati muschi indigeni e muschi trapiantati.

La raccolta e successiva analisi dei 5 centimetri terminali dei caulidii dei muschi indigeni appartenenti alla specie *Hypnum cupressiforme* (Figura 2), che rappresentano la "memoria passata" in quanto coprono circa 15 anni di deposizioni, ha permesso di identificare un'area di 70-100 km² comprendente la città di La Spezia, dove le concentrazioni di Pb e Cu (Figure 3 e 4) sono significativamente più elevate dei valori riscontrati nel restante territorio indagato che aveva una superficie pari a circa 1000 km². I risultati ottenuti con i 5 centimetri dei muschi utilizzati hanno inoltre confermato, sempre nel territorio più ristretto, che la qualità dell'aria per il periodo stimato, presentava una qualità minore rispetto alla restante zona di indagine.

Il trapianto di muschi, che può essere considerato come la "memoria presente" delle deposizioni, ha permesso di monitorare nella medesima area, per il periodo di un anno mediante tre prelievi quadrimestrali, le ricadute di As e Cu (Figure 5 e 6). Le concentrazioni più elevate sono presenti nella medesima area di 70-100 km², la zona di ricaduta è controllata dai regimi di vento, mentre le differenti concentrazioni riscontrate nell'arco dell'anno sono influenzate dai regimi delle precipitazioni.

In una micro area, che si trova nel comune di Arcola, avente una superficie di 3-4 km², i trapianti di muschio hanno permesso di identificare e discriminare nel corso di un anno di controllo sia i contaminanti presenti sia l'entità della superficie coinvolta dalla contaminazione. La distribuzione della concentrazione di Pb (Figura 7), principale contaminante per la presenza di una fonderia che ricicla batterie esauste, si trova nelle immediate vicinanze della fonte in questione, mentre il Mn (Figura 8) non essendo presente nei materiali da fondere, registra una distribuzione pressochè omogenea su tutta l'area.

L'utilizzo dei muschi semplifica il monitoraggio e minimizza le incertezze dovute dall'ambiente, permette inoltre la ricostruzione delle contaminazioni per un periodo retroattivo di 15-20 anni. I muschi possono essere utilizzati con successo in città, piccoli

ambienti o estese aree. Permette, utilizzando un fattore di efficienza, di valutare il tasso di deposizione annuo, quindi di avere una stima dei contaminanti presenti nell'aria. Sarebbe pertanto auspicabile un largo utilizzo dei muschi per identificare le aree maggiormente contaminate, essendo il metodo di facile impiego e poco costoso.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il dottore M. Ferretti (LINNÆA ambiente Srl) per i preziosi suggerimenti.



Figura 2. Muschio appartenente alla specie Hypnum cupressiforme utilizzato nelle tre località.

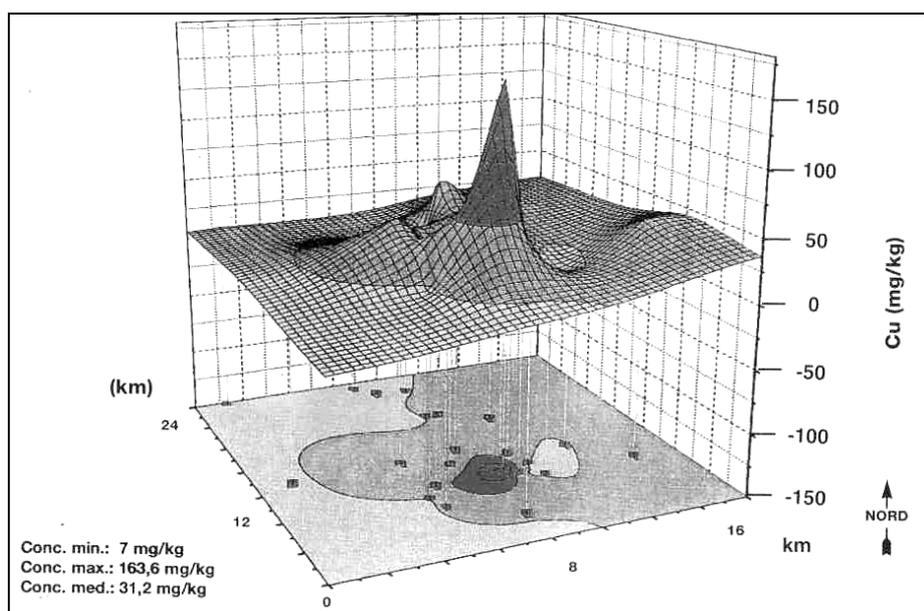
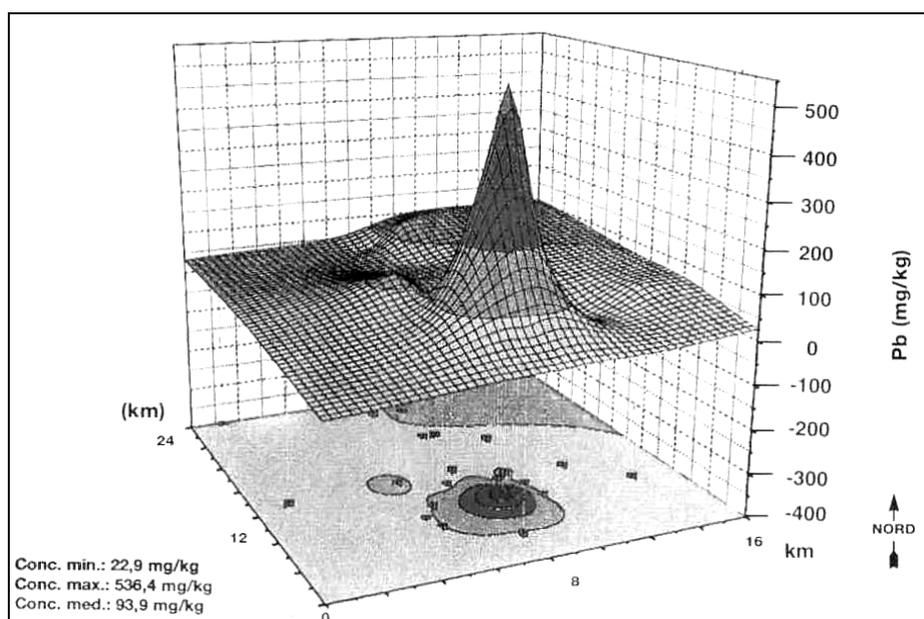


Figura 3 (in alto). Distribuzione spazio-temporale della concentrazione di Pb mediante muschio indigeno nella provincia di La Spezia.

Figura 4 (in basso). Distribuzione spazio-temporale della concentrazione di Cu mediante muschio indigeno nella provincia di La Spezia.

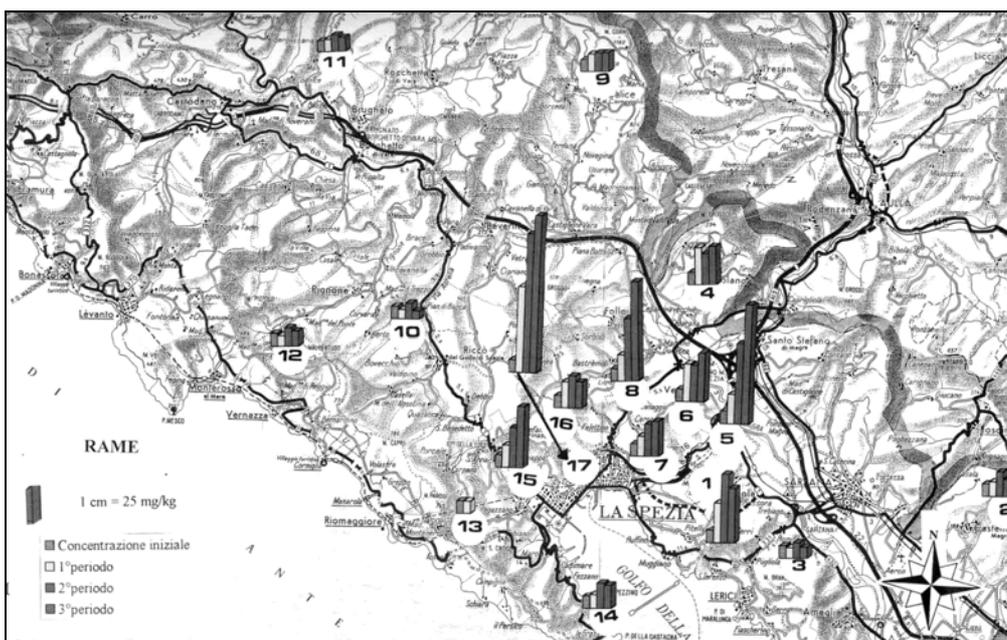
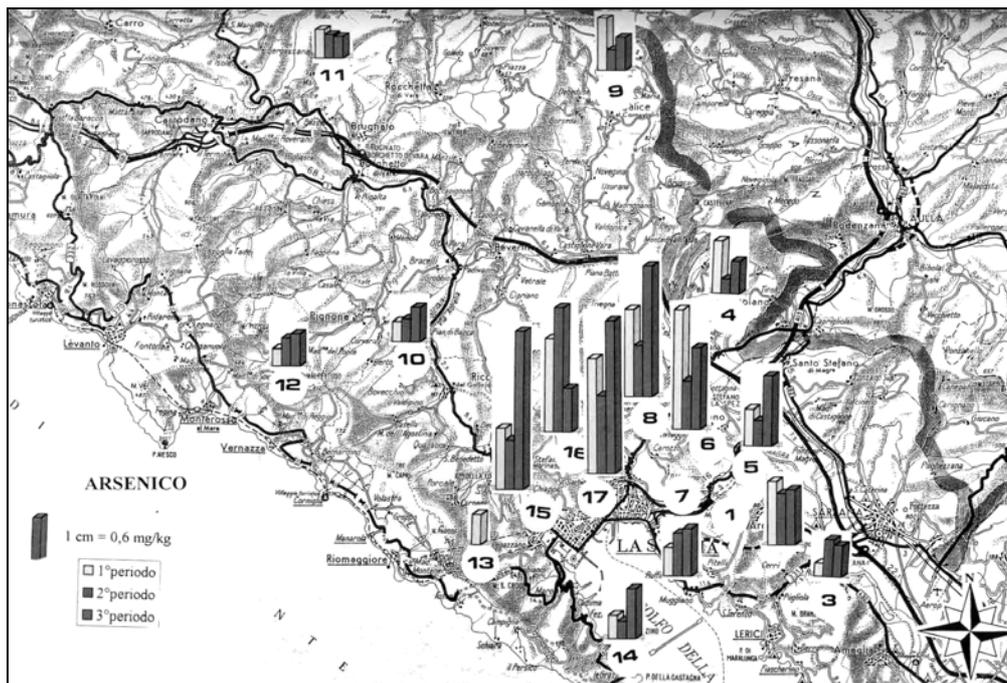


Figura 5 (in alto). Andamento della concentrazione di As nella provincia di La Spezia nel periodo di un anno mediante muschio trapiantato.
 Figura 6 (in basso). Andamento della concentrazione di Cu nella provincia di La Spezia nel periodo di un anno mediante muschio trapiantato.

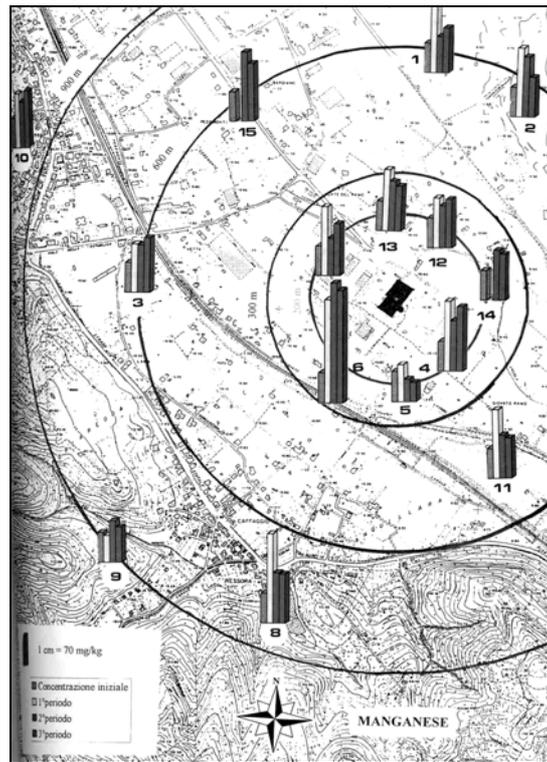
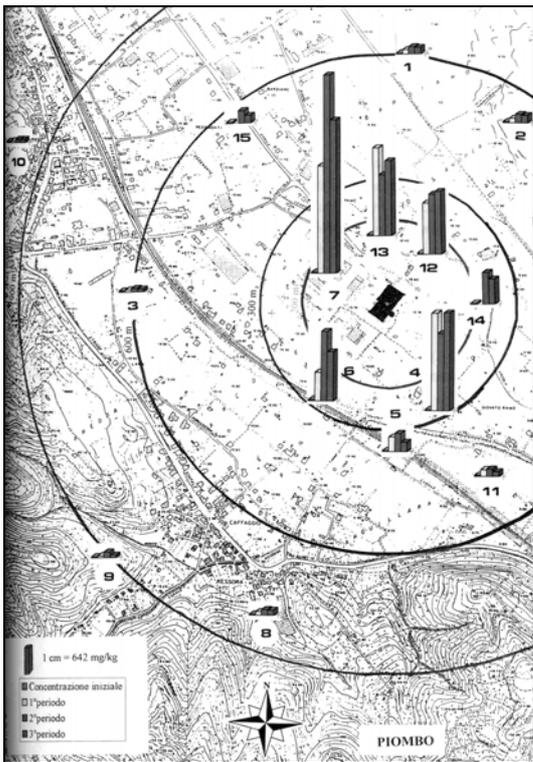


Figura 7 (sinistra). Distribuzione della concentrazione di Pb nel comune di Arcola per un periodo di un anno mediante muschio trapiantato.

Figura 8 (destra). Distribuzione della concentrazione di Mn nel comune di Arcola per un periodo di un anno mediante muschio trapiantato.

Bibliografia

- Anschütz I., Gessner F. (1954). Der Ionenaustausch bei Torfmossen (Sphagnum). *Flora*, 141: 178-236.
- Bargagli R., Battisti E., Cardaioli E., Formichi P., Nelli L. (1994). La deposizione atmosferica di elementi in tracce in Italia. Prime rivelazioni mediante i muschi. *Inquinamento*, 2: 48-58.
- Bell P.R. (1959). The ability of Sphagnum to adsorb cations preferentially from dilute solutions resembling natural waters. *Journal of Ecology*, 47: 351-355.
- Berg T., Steinnes T. (1997). Recent trends in atmospheric deposition of trace elements in Norway as evident from the 1995 moss survey. *The Science of the Total Environment*, 208: 197-206.
- Berlekamp J., Herpin U., Matthies M., Lieth H., Markert B., Weckert V., Wolterbeek B., Verburg T., Zinner H.-J., Siewers U. (1998). Geographic classification of heavy metal concentrations in mosses and stream sediments in the Federal Republic of Germany. *Water, Air and Soil Pollution* 101: 177-195.
- Brown D.H. (1982). Mineral nutrition. *Bryophyte ecology*, 383-444.
- Brown D.H. (1984). Uptake of Mineral Elements and Their Use in Pollution Monitoring. *The experimental Biology of Bryophytes*, 229-255.
- Burton M.A.S. (1990). Terrestrial and aquatic bryophytes as monitors of environmental contaminants in urban and industrial habitats. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 104: 267-280.
- Cenci R.M., (1993). Muschi acquatici quali bioindicatori della contaminazione da elementi in tracce. Istituto della Enciclopedia Italiana fondata da Giovanni Treccani. *Cultura e Scuola*.
- Cenci R.M., Muntau H. (1993). L'utilizzo dei muschi acquatici quali bioindicatori di inquinamento nelle acque da parte di metalli pesanti. *Inquinamento*, 25(1): 42-48.
- Cenci R.M., Palmieri F. (1997). L'impiego dei muschi terrestri e del suolo per valutare le deposizioni atmosferiche di origine antropica. *Inquinamento* 1: 36-45.
- Cenci R.M., Palmieri F., Facchetti S., Mousty F., Panzeri V. (1998). Le deposizioni atmosferiche in una micro-area, valutate utilizzando suoli e muschi. *Biologi Italiani* 28: 10, 20-36.
- Cenci R.M., Palmieri F., Neri R., Paracchini L., Papucci C. (1995). Muschi e suoli per il controllo della contaminazione ambientale da metalli. *Convegno "La Città e l'ENEL"*. Comune della Spezia, 93-120.
- Clymo R.S (1963). Ion exchange in Sphagnum and its relation to bog ecology. *Annals of Botany, N.S.*, 27: 309-324.
- Gerola F.M. (1988). *Biologia vegetale. Sistematica Filogenetica*. UTET, II ediz., 351-364.
- Goltsova N., Vasina T. (1993). Heavy metals retention by the woodland moss *Pleurotium schreberi*, Leningrad region survey. *Ecol. Chem* 1: 51-60.
- Goodman G.T., Roberts T.M. (1971). Plants and soils as indicators of metals in the air. *Nature*, 231: 287-292.
- Herpin U., Markert B., Weckert V., Berlekamp J., Friese K., Siewers U., Lieth H. (1997). Retrospective analysis of heavy metal concentrations at selected locations in the Federal Republic of Germany using moss material from a herbarium. *The Science of the Total Environment*, 205: 1-12.

- Herpin U., Berlekamp J. (1996). The distribution of heavy metals in a transect of the three states: the Netherlands, Germany and Poland, determined with the aid of moss monitoring. *The Science of the Total Environment* 187: 185-198.
- Knight A.H., Crooke W.M., Inkson H.E. (1961). Cation-exchange capacities of tissues of higher and lower plants and their related uronic acid contents. *Nature*, 192: 142-143.
- Little P., Martin M.H. (1974). Biological monitoring of heavy metal pollution. *Environ. Pollution*, 6: 1-19.
- Manning W.J., Feder W.A. (1980). *Biomonitoring air pollutants with plants*. Applied Science Publishers, London: 285 pp.
- Markert B., Weckert V. (1989). Fluctuations of element concentrations during the growing season of *Polytrichum formosus* (Hedw.). *Water, Air and Soil Pollution* 43: 177-189.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, waters and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134-139.
- Pilegaard K. (1979). Heavy metals in bulk precipitation and transplanted *Hypogymnia physodes* and *Dicranoweisia cirrata* in the vicinity of a Danish steelworks. *Water, Air and Soil Pollution* 11: 77-91.
- Puustjärvi V. (1955). On the colloidal nature of peat-forming mosses. *Archivum societatis zoologicae botanicae Fennicae "Vanamo"*, Supplement 9: 257-272.
- Rao D.N. (1982). Responses of bryophytes to air pollution. *Bryophyte ecology*, 445-471.
- Rasmussen L., Johnsen I. (1976). Uptake of minerals, particularly metals, by epiphytic *Hypnum cupressiforme*. *Oikos* 27: 483-487.
- Rühling A., Tyler G. (1969). Ecology of heavy metals – a regional and historical study. *Botaniska Notiser*, 122: 248-259.
- Rühling A., Tyler G. (1970). Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw). *Br. Et Sch. Oikos*, 21: 92-97.
- Rühling A. (1994). Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe. *Nord*, 58.
- Shimwell D.W., Lauria A.E. (1972). Lead and zinc contamination of vegetations in the southern Pennines. *Environmental Pollution*, 3: 291-301.
- Strahler A.N. (1984). *Geografia fisica*. Piccin, 1984: 271-280.
- Zechmeister H. (1998). Annual growth of four pleurocarpous moss species and their applicability for biomonitoring heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 52: 441-451.