



Trasmissione a mezzo p.e.c.

Istituto Superiore per la Ricerca Ambientale
- ISPRA
Viale Vitaliano Brancati, 48
00148 – ROMA
Dott. Stefano Laporta

Spett.le
Ministero dell’Ambiente e della Tutela
del Territorio e del Mare
DG Valutazioni Ambientali
Via C. Colombo, 44
00147 ROMA
Dott. Giuseppe Lo Presti
aia@pec.minambiente.it

Spett.le
Commissione Istruttoria AIA-IPPC
c/o ISPRA
Viale Vitaliano Brancati, 48
00148 ROMA

Spett.le
Dipartimento di Prevenzione
ASL Taranto
Via Diego Peluso, 117
74121 TARANTO
Dott. Michele Conversano
dipartprevenzione.asl.taranto@pec.rupar.puglia.it

Spett.le
Istituto Superiore di Sanità - ISS
Via Regina Elena, 299
00161 ROMA
Dott. Alessandro Alimonti
Dott.ssa Elena De Felip
protocollo-centrale@iss.mailcert.it

Spett.le
ARPA PUGLIA
Direzione Generale
Corso Trieste, 27
70126 BARI
dir.generale.arpapuglia@pec.rupar.puglia.it





Taranto, 23/09/2016
Ns. Rif. Dir. 59/16

Oggetto : Decreto DVA –DEC-2012-0000547 del 26/10/2012 – Stabilimento ILVA S.P.A.
di Taranto – Prescrizione n° 93 e Decreto MATTM n°194 del 13/07/2016 (P.M.C.)

Con riferimento a quanto previsto nel Riesame del Piano di monitoraggio e controllo prot. n°194 del 13/07/2016 (G.U. n° 174 del 27/07/2016), si trasmette in allegato la “Procedura operativa per la gestione delle campagne della rete di biomonitoraggio della qualità dell’aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto”, redatto da TerraData S.r.l.

Si coglie altresì l’occasione per evidenziare che:

1. con nota Dir 352/16 del 3/08/2016 è stato richiesto al Dipartimento di Prevenzione della ASL di Taranto di aggiornare il progetto di studio di monitoraggio della contaminazione da diossine e PCB nel latte delle specie bovina, ovina e caprina e nei mitili del 19/02/2014 e di comunicare i relativi costi, al fine di predisporre un contratto di ricerca con ILVA;
2. con nota Dir 353/16 del 3/08/2016 è stato richiesto all’Istituto Superiore di Sanità di inviare a ILVA relazioni trimestrali sullo stato di avanzamento delle attività relative al monitoraggio sul latte materno e sugli esiti delle stesse.

Si resta a disposizione per eventuali chiarimenti e/o valutazioni.

Distinti saluti

ILVA S.p.A. in Amministrazione Straordinaria
Stabilimento di Taranto
Il Direttore
Ing. Ruggero Cola

Allegati c.s.d.

ILVA S.p.A. IN AMMINISTRAZIONE STRAORDINARIA
via Appia 55 km 648 – 74123 Taranto – tel. +39 099 4811 – fax +39 099 4812271 – telex 860049



Sede Legale e Operativa: viale Certosa 239 – 20151 Milano – tel. +39 02 300351 – fax +39 02 30035536
Cap.Soc. euro 549.390.270,00 int.vers. – codice fiscale, partita IVA e numero iscrizione registro imprese Milano: 11435690158

Biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto

Risposta alle osservazioni di ARPA Puglia sui limiti di quantificazione (LOQ) delle determinazioni di POPs (diossine, furani, IPA e PCB), a seguito del sopralluogo presso il laboratorio CAIM in data 30/09/2015.

Per quanto riguarda l'analisi di IPA e PCB, effettuate dal laboratorio CAIM di Follonica, il LOQ di ogni analita è stato determinato secondo quanto riportato al punto 9.7 del metodo EPA 8000D rev. 4 del luglio 2014.

In particolare:

- il LOQ di ogni IPA è risultato pari a 2,0 µg/kg s.s. Tale limite è risultato inferiore a quello comunemente presente nella letteratura riguardante la determinazione di IPA in matrici ambientali (1, 2) e in linea con quello richiesto dai criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per gli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti: punto c, tabella 7 del Reg. (UE) N. 836/2011.
- il LOQ di ogni PCB è risultato pari a 0,10 µg/kg s.s. Tale limite è risultato largamente inferiore alla concentrazione soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (60 µg/kg): allegato 5, tabella 1, parte A del D. Lgs 152/2006 e confrontabile con la concentrazione soglia di contaminazione delle acque sotterranee (0,01 µg/l): allegato 5, tabella 2, del D. Lgs 152/2006.

Riassumendo, come già evidenziato nell'Annesso D1 (Precisazioni ai Rapporti di Prova) alla relazione finale della campagna di monitoraggio di IPA e PCB del 2015 (3), i LOQ dichiarati nei rapporti di prova da 2698-1 a 2698-33, da 2699-1 a 2699-2 emessi il 30 ottobre 2015 e da 3619-1 a 3619-72 del 18 novembre 2015 sono in linea con quelli normalmente considerati per gli alimenti, per suolo e sottosuolo per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale e per indagini ambientali. Inoltre, la quantità di campione processata è quella richiesta nei metodi ufficiali adottati.

Tuttavia, per venire incontro alle osservazioni di ARPA Puglia riportate nel Verbale di Esecuzione Visita Ispettiva Ordinaria Parte II del DPCM 14-03-14 in riferimento alla Prescrizione 93 DVA-DEC_2012-00547, per le analisi di IPA e PCB sulle matrici oggetto dello studio di biomonitoraggio

(aghi di pino e cavoli) nelle campagne successive il laboratorio CAIM si impegna a ridurre il limite di quantificazione degli analiti oggetto dello studio.

In particolare, migliorando l'efficacia del processo di purificazione degli estratti, aumentando la sensibilità strumentale e aumentando la quantità di campione processata, riteniamo che sia possibile:

- ridurre a circa 1/10 il limite di quantificazione di ogni PCB;
- ridurre a circa 1/4 il limite di quantificazione di ogni IPA.

Bibliografia

(1) ARPA Friuli Venezia Giulia – Dipartimento di Trieste. Relazione 2007. Monitoraggio di IPA aerodispersi nella provincia di Trieste tramite Moss – Bags e quadrelli come accumulatori. Nordio Miani, Nicola Skert, Luigi Giorgini, Jari Falomo e Roberto Grahonja

(2) ARPA Emilia Romagna – Sezione di Reggio Emilia. Relazione 2002. Individuazione e valutazione dei livelli di microinquinanti organici e metalli nel territorio del comune di Reggio Emilia

(3) Brunialti G., Frati L., Nali C., Landi M., Pellegrini E., Calderisi M., Ferretti M., 2016. Rilevamento della presenza di PCDD/F, IPA e PCB nei tessuti vegetali nell'ambito della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. Monitoraggio anno 2015. Rapporto tecnico TDe R 96-2016/01 (V1 R0), 105 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati). ANNESSO D1 – Relazione sui metodi analitici (CAIM e Eco-Research). ANNESSO D5 – Nota aggiuntiva ai Rapporti di Prova (LOD e LOQ).

Biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto

Risposta alle osservazioni di ARPA Puglia sui limiti di quantificazione (LOQ) delle determinazioni di POPs (diossine, furani, IPA e PCB), a seguito del sopralluogo presso il laboratorio CAIM in data 30/09/2015.

Per quanto riguarda l'analisi di diossine e furani, effettuate presso il laboratorio Eco-Research di Bolzano, il LOQ di ogni analita è stato determinato utilizzando il metodo EPA 1613B 1994 con la variante che la retta di taratura prevista dalla metodica e reperibile sul mercato, viene diluita di un fattore 10. In tal modo si ottengono dei limiti di quantificazione che sono un decimo di quelli riportati dal metodo estraendo 10 g come prescritto. Tale retta viene utilizzata anche per la quantificazione di diossine/furani negli alimenti e quindi ritenuta dal laboratorio appropriata anche per le valutazioni di impatto ambientale.

I LOQ relativi alle diossine e ai furani analizzati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Valori di LOQ di diossine e furani raggiunti nell'indagine 2015

DIOSSEINE-FURANI 2,3,7,8 CLOROSOSTITUITI	LOQ ng/kg s.s.
2,3,7,8-TeCDD	0,1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,5
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,5
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,5
OCDD	1
2,3,7,8-TeCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,5
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,5
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,5
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,5
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,5
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,5
OCDF	1

Riassumendo, come già evidenziato nell'Annesso D1 (Precisioni ai Rapporti di Prova) alla relazione finale della campagna di monitoraggio di PCDD/F, IPA e PCB del 2015 (1), i LOQ dichiarati sono in



linea con quelli normalmente considerati per Indagini ambientali. Inoltre, la quantità di campione processata è quella richiesta nei metodi ufficiali adottati.

Tuttavia, per venire incontro alle osservazioni di ARPA Puglia riportate nel Verbale di Esecuzione Visita Ispettiva Ordinaria Parte II del DPCM 14-03-14 in riferimento alla Prescrizione 93 DVA-DEC_2012-00547, per le analisi di PCDD/F sulle matrici oggetto dello studio di biomonitoraggio (aghi di pino e cavoli) nelle campagne successive, il laboratorio Eco-Research si impegna a ridurre il limite di quantificazione degli analiti oggetto dello studio.

In particolare, migliorando l'efficacia del processo di purificazione degli estratti, aumentando la sensibilità strumentale e aumentando la quantità di campione processata, riteniamo che sia possibile ridurre il limite di quantificazione di ogni Dibenzo-p-diossina e di ogni Dibenzofurano ai valori già ottenuti in precedenza da parte dei tecnici di ARPA Puglia.

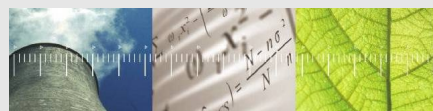
Bibliografia

(1) Brunialti G., Frati L., Nali C., Landi M., Pellegrini E., Calderisi M., Ferretti M., 2016. Rilevamento della presenza di PCDD/F, IPA e PCB nei tessuti vegetali nell'ambito della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. Monitoraggio anno 2015. Rapporto tecnico TDe R 96-2016/01 (V1 R0), 105 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati). ANNESSO D1 – Relazione sui metodi analitici (CAIM e Eco-Research). ANNESSO D5 – Nota aggiuntiva ai Rapporti di Prova (LOD e LOQ).

Procedura operativa per la gestione delle campagne della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto

TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]

www.terradata.it



Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	1/36

Forma raccomandata di citazione:

Brunialti G., Frati L., Nali C., Pellegrini E., Ferretti M., 2016. Procedura operativa per la gestione delle campagne della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE], 36 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati).

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	2/36

Procedura operativa per la gestione delle campagne della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto

TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]

Storia del documento	
Preparato per	ILVA S.p.A.
All'attenzione di	Egr. Dr. Luciano Greco Servizio Sanitario ILVA Taranto Via Appia km 648, 74123 Taranto e-mail: luciano.greco@gruppoilva.com
Referente per TerraData	Dr. Giorgio Brunialti, brunialti@terradata.it , tel. +39 349 4667762 Ufficio: 0566 916681
Numero di pagine	36
Preparazione documento (V1 R0)	Brunialti G., Frati L., Nali C., Pellegrini E. Ferretti M.
Data	21 settembre 2016
Prima revisione (V1 R1)	
Data	
Documento finale (V1 R1)	
Data	
Seconda revisione	-
Data	-
Documento finale (V1 R2)	-
Data	-

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	3/36

SOMMARIO

1. Obiettivo della proposta	5
2. Procedura operativa per la rete di rilevamento della biodiversità lichenica	7
2.1 Introduzione	7
2.2 Rilevamento	8
2.3 Scale interpretative dei valori IBL.....	8
3. Procedura operativa per la rete di rilevamento del bioaccumulo nei licheni.....	9
3.1 Introduzione	9
3.2 Preparazione degli espositori con campioni lichenici.....	10
3.3 Esposizione, raccolta e pulizia del materiale lichenico	10
3.4 Analisi chimiche	11
4. Procedura operativa per la rete di biondicazione dell'ozono	11
4.1 Introduzione	11
4.2 Allevamento delle piante bioindicatrici	11
4.3 Esposizione e raccolta dei <i>kit</i> di germinelli.....	12
4.4 Stima delle risposte biologiche.....	13
5. Procedura operativa per la rete di rilevamento di IPA e PCDD/F in <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	14
5.1 Introduzione	14
5.2 Coltivazione delle piante di <i>B. oleracea</i> (cv. "Hammer/Grüsa")	15
5.3 Preparazione dei contenitori "a reservoir"	15
5.4 Allestimento delle stazioni e sopralluoghi periodici	16
5.5 Raccolta dei campioni	16
5.6 Preparazione dei campioni per le analisi	17
5.7 Analisi chimiche	17
6. Procedura operativa per la rete di rilevamento di IPA e PCDD/F negli aghi di pino.....	17
6.1 Introduzione	17
6.2 Raccolta campioni di aghi di pino.....	19
7. Procedure analitiche	20
7.1 Bioaccumulo nei licheni.....	20
7.1.1 Qualità dei dati: analisi del materiale standard	21
7.1.2 Valori di accumulo nei campioni esposti	21
7.2 Bioaccumulo in aghi di pino e brassica	22
7.2.1 Risposta alle osservazioni di ARPA Puglia sui limiti di quantificazione (LOQ)	23
8. Tempistiche della rete	24
9. Soggetti coinvolti	26
10. Bibliografia essenziale	29
11. Annessi	34

Progetto <i>Project</i>	Responsabile <i>Responsible</i>	Documento <i>Document</i>	Avanzamento <i>Progress</i>	Data <i>Date</i>	Stato <i>Status</i>	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	4/36

1. Obiettivo della proposta

La presente proposta risponde all'esigenza di ILVA S.p.A. in Amm. Straordinaria (di seguito indicata come ILVA) di fornire a ISPRA una procedura operativa per la gestione delle campagne di monitoraggio, in cui siano esplicitate le varie fasi con le relative tempistiche e i soggetti coinvolti (Piano di Monitoraggio e Controllo del 23.06.2016, pag. 104).

Come previsto dal Piano di Monitoraggio e Controllo del 23.06.2016, tale procedura dovrà essere concordata tra ISPRA, ISS, ASL, ARPA Puglia e ILVA S.p.A. e trasmessa da ISPRA al MATTM.

I servizi specialistici previsti nell'ambito dell'incarico conferito da ILVA a TerraData sono i seguenti:

1. rilevamento della rete di bioindicazione mediante licheni epifiti (Indice di Biodiversità Lichenica, IBL) in corrispondenza di 42 stazioni, per un totale di 135 alberi;
2. rilevamento della rete di bioaccumulo mediante licheni (18 elementi: Al, As, Ba, Be, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Te, Ti, Tl, V, Zn), in corrispondenza di 41 stazioni;
3. rilevamento della rete di biomonitoraggio dell'ozono mediante piante vascolari (germinelli di tabacco), in corrispondenza di 28 stazioni;
4. rilevamento della presenza di IPA, diossine e furani nei tessuti vegetali di piante di *Brassica oleracea*, in corrispondenza di 24 stazioni;
5. rilevamento della presenza di IPA, diossine e furani nei tessuti vegetali di aghi di pino in corrispondenza di 11 stazioni.

Le prime tre attività fanno riferimento all'esplicita richiesta della prescrizione A.I.A. N. 93, che nello specifico recita:

"Il Gestore dovrà provvedere, entro 6 mesi dal rilascio del provvedimento di riesame dell'AIA, a realizzare una rete di biomonitoraggio, concordandone le modalità con l'Ente di controllo. Le aree/quartieri da monitorare sono almeno i seguenti: Lido Azzurro, aree adiacenti gli stabilimenti ex Sural-Fonderie e S. provinciale 39, Statte (da concordare con il Comune competente), Paolo VI nei pressi dell'Ospedale Moscati, Paolo VI zona ipermercato, Tamburi, centro città, Mar Piccolo primo seno e secondo seno, Parco Cimino, Talsano (confine quartiere Tramontone), San Donato, Lama, San Vito. Il biomonitoraggio dovrà avere le seguenti finalità:

- *rilevare l'indice di biodiversità lichenica in riferimento agli inquinanti SO₂ ed NO_x;*
- *monitorare i licheni come bioaccumulatori di metalli;*
- *biomonitorare l'ozono mediante piante vascolari (es. Nicotiana tabacum)".*

Tali attività sono state e saranno svolte in conformità alla richiesta ILVA 14037/14 e in riferimento all'offerta di TerraData 2014/1 del 07.02.2014. Inoltre, il rilevamento della rete di bioindicazione e bioaccumulo prevede di seguire il programma e le modalità previste dallo

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	5/36

studio di fattibilità condotto nel corso del 2013 (Brunialti et al., 2013) e approvato dal Tavolo Tecnico ISPRA.

Le attività relative ai precedenti punti 4 e 5 rispondono all'esigenza di ILVA di allinearsi alle risultanze dei lavori del Tavolo Tecnico istituito presso ISPRA al fine di valutare lo stato di avanzamento delle attività legate alla prescrizione n. 93 (verbale ISPRA, nota n. 9845 del 5.3.2013). Infatti, come riportato nel verbale, *"il tavolo tecnico ha espresso parere positivo sulla richiesta di ARPA Puglia di inserire nel piano di biomonitoraggio ambientale rilievi sulla presenza di IPA, diossine e furani nei tessuti vegetali"*. A tal proposito il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, con lettera prot. 395/14 del 30/07/2014, invitava ILVA a *"fare in modo che la nuova proposta di piano di monitoraggio che dovrà essere presentata per dare attuazione a quanto previsto dall'art. 2, comma 7, del DPCM sia allineata alle risultanze dei lavori del tavolo tecnico"*.

Come riportato nello studio di progettazione e fattibilità (Brunialti et al. 2013) e specificato nella riunione tenutasi presso ISPRA il 21 gennaio 2014 (verbale ISPRA, nota n. 9845 del 5/3/2013), i risultati della ricerca bibliografica condotta da TerraData sull'uso di bioindicatori per il monitoraggio di questi composti hanno individuato il metodo standardizzato VDI 3957 (2000, 2008), che prevede l'utilizzo di piante del genere *Brassica* (cavolo), come il più adatto per il territorio in esame. A questo proposito è necessario ribadire che il Tavolo Tecnico ha espresso parere positivo all'utilizzo di questo metodo.

Inoltre, a seguito della richiesta esplicita di ARPA Puglia (da verbale ISPRA, nota n. 9845 del 5/3/2013: *"ARPA Puglia richiede ufficialmente l'uso di aghi di pino in affiancamento delle brassicacee"*), la proposta include anche il rilevamento di una rete di monitoraggio di questi inquinanti mediante la raccolta e l'analisi di aghi di pino come metodo complementare a quello che prevede l'esposizione di cavoli alloctoni.

A questo proposito TerraData, in data 27 ottobre 2014, aveva presentato la proposta 2014/11 [ILVA-DIOSSINE] (Brunialti et al. 2014), anch'essa sottoposta all'approvazione del Tavolo Tecnico ISPRA.

A queste attività, come previsto dall'ordinazione n. 9728 (pos. N. 5 codice 9830775) che disciplina l'incarico di TerraData, si aggiunge la prestazione professionale di *"elaborazione integrata dei dati rilevati mediante le reti di bioindicazione, di biomonitoraggio e di bioaccumulo durante le due campagne anno 2014 ed anno 2016"*.

Il presente documento riporta una proposta di procedure operative da adottare per la gestione delle campagne della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto in conformità alla prescrizione A.I.A. N. 93 e alle risultante dei lavori del Tavolo Tecnico istituito presso ISPRA.

Si precisa che la prescrizione n. 93 fa riferimento a metodologie ben note e consolidate nel settore del monitoraggio biologico dell'ambiente. In questo documento se ne riassumono gli

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	6/36

elementi essenziali. La descrizione dettagliata dei protocolli operativi riconosciuti a livello nazionale è riportata nell'Annesso B dello studio di fattibilità condotto da TerraData nel corso del 2013 (Brunialti et al., 2013). Inoltre, si rimanda anche ai *Materiali e Metodi* contenuti nelle relazioni tecniche delle indagini svolte finora (Brunialti et al. 2015; Brunialti et al. 2016).

2. Procedura operativa per la rete di rilevamento della biodiversità lichenica

2.1 Introduzione

Questa metodologia viene applicata da decenni, in ambiti urbani, industriali e rurali, per valutare gli effetti dell'inquinamento atmosferico (Cislaghi e Nimis 1997; Asta et al. 2002; Giordani et al. 2002; Nimis et al. 2002; Castello e Skert 2005; Frati e Brunialti 2006; Giordani 2007; Brunialti et al. 2009). Esso si basa sullo studio della diversità delle specie licheniche epifite, presenti cioè sul tronco di alberi dell'area di studio. In particolare, poiché i licheni sono sensibili – nell'insieme dei vari fattori ecologici – anche all'effetto di gas tossici (principalmente SO₂ e NO_x), le comunità licheniche rispondono a tali inquinanti impoverendosi progressivamente all'aumentare delle loro concentrazioni atmosferiche (Asta et al. 2002). Al contrario, semplificando, più la diversità lichenica è alta, più le condizioni della zona considerata sono vicine a quelle ritenute di 'naturalità' (vedi sotto).

L'applicazione del metodo permette di ottenere le seguenti informazioni (ANPA 2001):

- 1) valori dell'Indice di Biodiversità Lichenica (IBL) da interpretare sulla base di una scala di naturalità/alterazione basata sulle deviazioni da condizioni ottimali delle comunità licheniche, in relazione all'inquinamento da gas tossici (SO₂ e NO_x);
- 2) verifica, su lunghi periodi di tempo, dell'efficacia di misure eventualmente introdotte per ridurre le emissioni di gas tossici (SO₂ e NO_x);
- 3) individuazione delle principali aree a rischio per l'eventuale localizzazione di strumenti di rilevazione e/o lo sviluppo di ricerche epidemiologiche.

Per una migliore interpretazione dei dati IBL, è comunque opportuno precisare che, come già ricordato nello studio di fattibilità (Brunialti et al. 2013), nonostante il metodo di bioindicazione mediante licheni epifiti sia utilizzato principalmente per la valutazione degli effetti dell'inquinamento atmosferico, la diversità, l'abbondanza e la distribuzione dei licheni sono influenzate anche da una serie di fattori macro- e micro-ambientali: aspetti topografici, climatici, morfologici e legati alla specie arborea su cui viene effettuato il rilevamento (Hilitzer 1925, Barkman 1958, McCune et al. 1997, Kantvilas e Minchin 1989, Will-Wolf et al. 2002, Giordani 2006, Brunialti et al. 2009). La standardizzazione del metodo permette di controllare alcune di queste variabili (specialmente quelle riferibili alla specie arborea ed alle sue caratteristiche), ma rimane tuttavia possibile l'influenza di altre, che in molti casi co-variano rispetto ai livelli di inquinamento (es. uso del suolo, distanza dal mare). Per questo motivo, come quasi sempre

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	7/36

accade in ecologia, è riduttivo interpretare tutta la variabilità della diversità lichenica sulla base dell'influenza di un solo fattore, in questo caso l'inquinamento atmosferico. Ciò è da tenere presente nell'interpretare i risultati dello studio.

2.2 Rilevamento

La Tabella 2.1 riporta le statistiche descrittive relative a ciascuna campagna di rilevamento della rete. Complessivamente sono state individuate 42 stazioni, ciascuna con un numero di alberi compreso tra due e sei, per un totale di 135 alberi appartenenti a cinque specie (*Olea europaea*, *Quercus ilex*, *Q. pubescens*, *Q. trojana* e *Tilia spp.*), che per affinità nelle caratteristiche della scorza, risultano incluse nello stesso gruppo di forofiti (gruppo di specie con scorza acida; ANPA 2001). Per ogni albero sono da effettuare quattro rilievi di biodiversità lichenica (rispettivamente a N, E, S, W; ANPA 2001) per un numero di 540 rilievi complessivi.

Tab. 2.1 – Quadro riassuntivo delle statistiche descrittive della rete.

Numero di rilievi	540
Numero totale di alberi	135
<i>Olea europaea</i>	18
<i>Quercus ilex</i>	73
<i>Quercus pubescens</i>	7
<i>Quercus trojana</i>	22
<i>Tilia spp.</i>	15
Numero di alberi per stazione (min-max)	2 – 6
Numero totale di stazioni	42

Il rilevamento dell'Indice della Biodiversità Lichenica deve essere effettuato utilizzando un reticolo costituito da quattro sub-unità di 10×50 cm, ciascuna divisa in cinque quadrati di 10×10 cm. I quattro elementi della griglia sono da posizionare verticalmente sul tronco in corrispondenza dei quattro punti cardinali principali (N, E, S, W) ad un metro dal suolo.

Il valore dell'Indice di Biodiversità Lichenica (IBL) del rilievo (sub-unità N, E, S e W) va ottenuto come la somma delle frequenze di ciascuna specie all'interno di ogni sub-unità del reticolo (ciascuna specie può avere una frequenza compresa tra 1 e 5), in accordo con quanto riportato nel manuale (ANPA 2001).

2.3 Scale interpretative dei valori IBL

L'interpretazione dei livelli di alterazione della diversità lichenica dovrà seguire il metodo, proposto da Loppi *et al.* (2002a, 2002b), basato sul discostamento percentuale dai valori massimi di IBL così come rilevati nelle diverse regioni bioclimatiche italiane. Questo metodo si basa sulla definizione di Nimis (1999), secondo cui le tecniche di biomonitoraggio stimano il grado di deviazione (alterazione) da condizioni "normali" o "naturali" provocato dagli effetti di disturbo ambientale (tra cui l'inquinamento atmosferico) su componenti sensibili degli

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	8/36

ecosistemi (in questo caso i licheni). È necessaria, perciò, una definizione operativa di “naturale” o “normale”. Per questo motivo, in accordo con altri studi simili (Nimis e Bargagli, 1999), la soglia di naturalità è stata stabilita nel valore di IBL corrispondente al 98° percentile della distribuzione. La media dei valori maggiori rispetto alla soglia di naturalità è stata considerata come massimo valore di IBL potenziale (100% naturalità). Le classi di naturalità/alterazione sono perciò ottenute sulla base di discostamenti percentuali da questo valore.

3. Procedura operativa per la rete di rilevamento del bioaccumulo nei licheni

3.1 Introduzione

I licheni epifiti sono largamente utilizzati come bioaccumulatori di contaminanti persistenti quali metalli, radionuclidi, non metalli come zolfo e fluoro, e composti xenobiotici come gli idrocarburi clorurati (Nimis e Bargagli 1999, Garty 2001, Minganti et al. 2003, Frati et al. 2005, Brunialti e Frati 2007, Hissler et al. 2008, Godinho et al. 2009, Augusto et al. 2010).

In particolare, nel presente studio è stato adottato il metodo di bioaccumulo in campioni lichenici ‘trapiantati’ (Garty 2001) utilizzando come specie biomonitor il lichene fruticoso *Pseudevernia furfuracea* var. *ceratea*. L'applicazione del metodo permette di ottenere le seguenti informazioni (Nimis e Bargagli 1999):

- 1) valori di concentrazione di elementi in traccia con un’alta densità di punti di misura;
- 2) individuazione di pattern geografici di trasporto e deposizione di tali elementi;
- 3) verifica, su lunghi periodi di tempo, dell’efficacia di misure eventualmente introdotte per ridurre le emissioni di metalli;
- 4) individuazione delle principali aree a rischio per l’eventuale localizzazione di strumenti di rilevazione e/o lo sviluppo di ricerche epidemiologiche.

Inoltre, il metodo dei trapianti di licheni consente di stabilire il periodo di tempo di esposizione, con la possibilità di attribuire l’accumulo effettivo dei metalli/elementi a un periodo ben definito di tempo (in questo caso tre mesi). Questo accorgimento è importante per ‘fotografare’ la situazione attuale del comparto atmosferico, senza sovrapposizioni con eventuali accumuli attribuibili a periodi di tempo più lunghi.

L’assunzione di base del metodo applicato è che la concentrazione degli elementi in traccia nei talli lichenici rifletta quella degli inquinanti in atmosfera (Herzig et al. 1989, Sloof 1995, Van Dobben et al. 2001, Tretiach et al. 2011). Tuttavia, come specificato sopra nel caso della biodiversità lichenica, trattandosi di una risposta biologica basata su meccanismi di accumulo legati alla fisiologia del lichene (accumulo intra- o extra cellulare, deposizione sul tallo; cfr. Sarret et al. 1998), è opportuno precisare che la quantità di elementi in traccia accumulata

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	9/36

dipende anche da fattori ambientali naturali (es. precipitazioni atmosferiche, temperatura) legati al periodo di esposizione.

La rete risulta costituita da 41 stazioni (3 repliche per stazione).

3.2 Preparazione degli espositori con campioni lichenici

Questa attività prevede lo svolgimento delle seguenti fasi:

- raccolta di materiale lichenico di *P. furfuracea* var. *ceratea* presso un sito remoto lontano da fonti inquinanti;
- determinazione del materiale lichenico (*P. furfuracea*) per distinguere la varietà *ceratea* utilizzata in questo studio dalla varietà *furfuracea*;
- lavaggio in acqua deionizzata dei campioni (c. 260 talli lichenici);
- preparazione di 130 espositori con materiale lichenico.

Tre talli devono essere scelti casualmente tra i 260 prelevati per rappresentare il campione di controllo. Dettagli tecnici più approfonditi in merito a questi aspetti sono riportati nella relazione tecnica (Brunialti et al. 2015; Annesso D1).

3.3 Esposizione, raccolta e pulizia del materiale lichenico

Gli espositori devono essere posizionati in corrispondenza di ciascuna delle 41 stazioni della rete di bioaccumulo (tre espositori per stazione, repliche). Ciascuno di essi è fissato sul tronco o sui rami di alberi, a un'altezza compresa tra 2,5 e 3,5 m, utilizzando del filo di plastica da giardinaggio. I campioni sono esposti per un periodo di tre mesi, trascorsi i quali il materiale viene raccolto e trasportato in laboratorio. Per evitare il danneggiamento e la contaminazione dei campioni, tutte le operazioni devono essere svolte utilizzando guanti in lattice e i campioni sono trasportati all'interno di buste per alimenti. I talli di *P. furfuracea* devono essere preparati per le analisi secondo le modalità riportate da Nimis e Bargagli (1999). In laboratorio i talli sono sottoposti ad un'accurata pulizia sotto il microscopio binoculare (10-40x) per eliminare materiali estranei, impurità, parti morte e residui di corteccia (Loppi *et al.*, 2005; Frati *et al.*, 2005). Queste operazioni sono condotte con pinzette di plastica e guanti in lattice, per evitare contaminazioni da metalli. Per ogni espositore, il campione da sottoporre alle analisi è il risultato di un miscuglio di materiale proveniente dai talli lichenici che lo componevano (c. 200 mg). I campioni puliti sono riposti all'interno di contenitori in plastica e consegnati al laboratorio di analisi per lo svolgimento delle analisi chimiche (cfr. Capitolo 7).

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	10/36

3.4 Analisi chimiche

Le procedure analitiche sono dettagliate nel Capitolo 7.

4. Procedura operativa per la rete di bioindicazione dell'ozono

4.1 Introduzione

La bioindicazione dell'ozono troposferico si basa sull'identificazione di sintomi fogliari specifici che compaiono su specie sensibili presenti o appositamente introdotte nell'area d'indagine. In estrema sintesi, maggiore è la frequenza dei sintomi, maggiore è la concentrazione di ozono presente nell'aria ambiente. L'approccio è ben consolidato e ampiamente utilizzato a livello mondiale (Vergé et al. 2002, Lorenzini et al. 2003, Nali et al. 2007, Ferretti et al. 2007, Sant'Anna et al. 2008, Cristofolini et al. 2011). In questo caso è stata adottata la metodica operativa dei *kit* miniaturizzati con germinelli di tabacco (Lorenzini 1999). Questo metodo consente di allestire una rete di rilevamento capillare coprendo un ampio raggio del territorio con esigenze logistiche minime disponendo di un ampio numero di individui in uno spazio concentrato, in modo che la ricchezza di dati possa compensare in parte la loro variabilità.

L'applicazione del metodo permette di ottenere le seguenti informazioni (Lorenzini 1999):

- valori dell'Indice di Danno Cotiledonare/Fogliare (IDC/F), da interpretare sulla base di una scala di intensità di danno, in relazione all'inquinamento da ozono;
- individuazione di pattern geografici della diffusione di questo inquinante;
- verifica, su lunghi periodi di tempo, dell'efficacia di misure eventualmente introdotte per ridurre le emissioni dei precursori di tale inquinante secondario (NO_x, COV);
- individuazione delle principali aree a rischio per l'eventuale localizzazione di strumenti di rilevamento e/o lo sviluppo di ricerche epidemiologiche.

4.2 Allevamento delle piante bioindicatrici

L'allevamento dei germinelli di tabacco (cvv. Bel-W3, O₃-sensibile e Bel-B, O₃-resistente) e l'allestimento dei *kit* da esporre in aria ambiente per ogni ciclo di monitoraggio deve essere svolto da personale tecnico esperto opportunamente addestrato, in accordo con le procedure normative indicate dall'ANPA [Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, ora Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA)] (Lorenzini 1999).

Il germoplasma di tabacco deve essere riprodotto in purezza e conservato in cella frigo (+4 °C) fino al momento dell'utilizzo. La semina, realizzata a spaglio su terriccio organico (Potgrond P Trionum), è da allestire a cadenza settimanale, in idonee terrine di terracotta (semenzai), adeguatamente umettate, drenate e mantenute in cella climatica ad aria filtrata (filtri a carbone

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	11/36

attivo), in condizioni luminose e igro-termiche controllate (temperatura di 20-23 °C; umidità relativa al 70-80%; fotoperiodo di 14 ore; intensità luminosa di 500-550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). L'emergenza e la completa distensione delle prime due foglioline cotiledonari (germinazione epigea) si verificano nell'arco temporale di circa 7-9 giorni. Dopo circa due settimane dalla semina, quando la prima foglia raggiunge una lunghezza di meno di 1 cm, il personale provvede all'allestimento dei singoli *kit*, ciascuno previamente contrassegnato con una sigla identificativa.

Un *kit* consiste in una piastra a sezione rettangolare (13×9 cm di lato) in polistirene, opportunamente adattata come da brevetto (Lorenzini 1994). Essa è costituita da 24 pozzetti a sezione circolare (16 e 20 mm, rispettivamente, di diametro e profondità), individuabili ciascuno da una lettera maiuscola in verticale (A, B, C e D) e da un numero progressivo in orizzontale (da 1 a 6), stampati in rilievo, lungo il perimetro della piastra.

Come da protocollo, una cella, corrispondente alla posizione C4, è completamente sprovvista di base. Le rimanenti sono dotate di un piccolo foro alla base (5 mm di diametro), che permette un adeguato umettamento della rizosfera per suzione idrica capillare dal sottostante contenitore ricolmo d'acqua, in cui i *kit* sono alloggiati. I 23 pozzetti devono essere riempiti di terriccio (il medesimo utilizzato per la semina) e in ciascuno di essi, mediante delicate operazioni di selezione e trapianto, effettuate da personale esperto, viene messo a dimora un germinello.

Per consentire l'adattamento post-trapianto e il raggiungimento dello stadio vegetativo idoneo (cotiledoni ben distesi e lunghezza della prima foglia di circa 1 cm), i *kit* allestiti come sopra sono mantenuti per ulteriori 4-5 giorni a temperatura e fotoperiodo naturale, in idonei box in plexiglass, rigorosamente ventilati con aria O₃-esente, immessa da un sistema forzato di filtraggio a carboni attivi, dislocati all'interno dell'infrastruttura della serra. Le plantule sono sottoposte ad un regime idrico ottimale (irrigazione per infiltrazione basale mediante riempimento del sottovaso) e non richiedono alcuna nutrizione integrativa, essendo il terriccio impiegato adeguatamente fertilizzato.

Tutte le pratiche colturali descritte sono condotte ogni settimana nel corso dell'intero periodo di biomonitoraggio, dall'ultima settimana a metà ottobre, suddiviso in 20 cicli espositivi consecutivi, della durata di sette giorni ognuno. Complessivamente, sono allestiti 100 *kit* a settimana e 2000 per l'intera campagna di biomonitoraggio.

4.3 Esposizione e raccolta dei *kit* di germinelli

I *kit* di germinelli devono essere posizionati in corrispondenza di ciascuna delle 28 stazioni della rete (tre *kit* per stazione, repliche), per venti cicli espositivi settimanali. L'allestimento di ciascuna stazione consiste nella collocazione di un'intelaiatura metallica (dimensioni 50×70 cm in basso, 40×55 cm in alto e 50 cm di altezza), totalmente rivestita di rete ombreggiante (fattore di ombreggiamento di 75%), in accordo con il protocollo dell'ANPA (Lorenzini 1999), e dotata di base superiore o spigolo laterale apribile. In funzione della tipologia dell'area occupata (ad

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	12/36

esempio, pieno suolo o sovrastruttura, pavimentazione di un fabbricato o asfalto), essa è assicurata al piano d'appoggio, mediante chiodi o pesi, disposti ai quattro angoli o lungo due lati.

All'interno della stazione è alloggiato un contenitore in polistirolo a sezione rettangolare (37×52 cm di lato; 18 cm di altezza), riempito per circa 2/3 di acqua e opportunamente forato da un lato, poco al di sotto del bordo, al fine di assicurare un adeguato smaltimento dell'eventuale surplus idrico, accumulabile in caso di pioggia o eccessivo rabbocco.

All'inizio di ogni ciclo espositivo, i *kit* a dimora devono essere posti ognuno in una delle tre cavità (13×9 cm) appositamente sagomate in fogli di polistirolo (27×43 cm), a loro volta adagiati sul pelo libero dell'acqua contenuta nel recipiente di cui sopra, in modo da riprodurre un sistema di contenitori a *reservoir*. Per ciascuna stazione, devono essere collocati tre *kit*.

Le operazioni inerenti la collocazione *in situ* dei bioindicatori all'inizio di ogni periodo espositivo e il relativo ritiro, alla fine dello stesso, devono essere accuratamente eseguite e documentate con fotocamera dal personale tecnico, che nel contempo provvede, al momento della messa a dimora delle piante, al rabbocco dei contenitori e alla compilazione di una scheda appositamente predisposta, volta alla registrazione delle sigle identificative dei singoli individui collocati e all'annotazione delle condizioni generali della stazione e del materiale vegetale trasportato.

4.4 Stima delle risposte biologiche

In accordo con il protocollo ANPA (Lorenzini 1999), il biomonitoraggio attivo dell'O₃ permette di correlare i livelli raggiunti da questo fotoinquinante nella troposfera con l'intensità dei sintomi fogliari che si manifestano sui germinelli della cv. Bel-W3 di tabacco O₃-sensibile. Il danno consiste in aree necrotiche tondeggianti del diametro di alcuni millimetri (*weather fleck*), localizzate a livello internervale su entrambe le superfici laminari di cotiledoni e foglie, con alterazione cromatica virante progressivamente nel tempo, dal grigio al bianco-avorio.

Al termine di ogni ciclo, immediatamente al momento del ritiro, ogni *kit* va acquisito come immagine in formato elettronico, con una fotocamera, in modo da creare un archivio iconografico permanente. Dopo, per esigenze logistiche di trasferimento, ciascun *kit* deve essere opportunamente chiuso e protetto con i rispettivi coperchi (inferiore e superiore). Il *kit* è mantenuto in tali condizioni per circa 12 ore successive al prelievo, in modo da rendere agevole il trasporto e nel contempo creare un ambiente umido e buio, sufficiente a preservare il materiale vegetale ed evitarne scambi gassosi con aria-ambiente di altro sito. Dopo ulteriori 24 ore di mantenimento in aria filtrata, si procede, su ciascun germinello di ogni *kit*, al riconoscimento visivo dei sintomi riconducibili alla sola presenza dell'inquinante e alla loro quantificazione. I danni, come da protocollo ANPA (Lorenzini 1999), sono stimati sulle prime tre lamine fogliari prodotte dalla pianta (i due cotiledoni e la prima foglia vera), con l'ausilio di una lente di ingrandimento e di materiale iconografico standard di comparazione, discernendo quelli

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	13/36

cagionati da avversità di altra origine. Essi sono espressi in termini di percentuale di area fogliare alterata, mediante l'attribuzione di indici di intensità secondo le "classi di danno" suggerite dalle linee guida di cui sopra: 0 = nessun danno fogliare, 1 >0-10%; 2 >10-25%; 3 >25-50% e 4 >50%. Sono escluse dal computo lamine in avanzato stato di senescenza e/o eccessivamente compromesse per cause di dubbia attribuzione. Le valutazioni dei sintomi fogliari devono essere condotte dai medesimi operatori e nelle stesse condizioni luminose per garantire un metro di misura costante ed unico, ottenendo perciò una maggiore ripetibilità dei dati. Su apposite schede di rilievo sono riportati, nel corso della stima, gli indici assegnati a ciascun cotiledone (contraddistinti indifferentemente come a e b) e alla prima foglia. Questi dati sono inseriti in fogli elettronici per le successive fasi di calcolo dei valori medi, mediani e modali finali degli Indici di Danno Cotiledonare (IDC), Fogliare (IDF) e di entrambe le matrici (IDC+F). Le successive elaborazioni statistiche devono essere condotte considerando come variabile di risposta la percentuale delle foglie e dei cotiledoni che presentano sintomi da ozono (accorpare perciò le classi di danno 1, 2 e 3). Allo stesso modo è considerata la percentuale di foglie e cotiledoni che non presentavano alcun sintomo da ozono (classe di danno 0).

5. Procedura operativa per la rete di rilevamento di IPA e PCDD/F in *Brassica oleracea* var. *acephala*

5.1 Introduzione

La procedura fa riferimento al metodo standardizzato dall'ente di normazione tedesco (Ordine degli ingegneri tedeschi, Verein Deutscher Ingenieure, VDI) che prevede l'esposizione di esemplari di cavolo appartenenti alla specie *Brassica oleracea* var. *acephala* per monitorare IPA, PCDD/F e PCB (VDI 3957, 2000). L'utilizzo di questo metodo, come evidenziato in fase di progettazione della rete, offre numerosi vantaggi, quali:

- i) la caratteristica cerosa delle foglie rende la brassica particolarmente adatta all'accumulo di questi inquinanti lipofili;
- ii) le dimensioni delle foglie garantiscono una buona quantità di materiale per le analisi;
- iii) l'esistenza di una linea guida riconosciuta da un ente di normazione (VDI 3957 2000, 2008);
- iv) trattandosi di organismi non autoctoni, che possono essere posizionati *ad hoc* sul territorio, è possibile selezionare le stazioni secondo un criterio oggettivo, che ne garantisca una distribuzione il più omogenea possibile. È perciò possibile adottare lo schema di rete proposto in fase progettuale.
- v) l'esposizione delle piante all'aria ambiente per due mesi, come previsto dalla norma tedesca VDI (VDI 3957 2000, 2008), consente di attribuire l'accumulo effettivo degli inquinanti ad un periodo ben definito di tempo, fornendo una 'fotografia' della situazione attuale del comparto

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	14/36

atmosferico, che potrà essere confrontata con i risultati delle indagini future, condotte con stessa stagionalità e tempistica.

La rete di biomonitoraggio risulta costituita da 24 stazioni (3 repliche per stazione).

5.2 Coltivazione delle piante di *B. oleracea* (cv. “Hammer/Grüsa”)

La semina e la crescita devono essere condotte in accordo con le linee guida della norma VDI 3957/Part 3 (2000, 2008), utilizzando semi di *B. oleracea* var. *acephala* (cv. “Hammer/Grüsa”).

I semi sono distribuiti uniformemente in semenzai di terracotta muniti di fori per il drenaggio nella parte inferiore e riempiti di terriccio Einheitserde Patzer ED73 in rapporto 8:1 (v:v) con sabbia fluviale lavata (come da protocollo). Dopo circa due settimane, le piante sono trapiantate singolarmente in vassoi alveolari di cartone pressato utilizzando lo stesso tipo di substrato (con relativa aggiunta di sabbia) come sopra descritto. Dopo ulteriori due settimane, le piante sono trasferite in vasi di 8x8x12 cm e, infine, una settimana prima dell’esposizione in vasi aventi un volume di 5 l. Prima del trasferimento delle piante, all’interno dei vasi da 5 l sono posizionate due corde in fibra di vetro (diametro di 0,5 mm e lunghezza di 1 m) necessarie per l’assorbimento dell’acqua per capillarità una volta che le piante vengono messe a dimora. Anche per queste due fasi finali è necessario utilizzato il substrato ED73 arricchito di sabbia nelle medesime proporzioni sopra descritte. Per tutto il periodo di coltivazione (circa otto settimane dalla semina), le piante sono irrigate con regolarità con acqua potabile. Una settimana prima dell’esposizione, le piante sono poste all’esterno per permettere loro di acclimatarsi e sono somministrati loro 100 ml di soluzione nutritiva costituita come segue: 5,8 g l-1 KH₂PO₄; 8,5 g l-1 KNO₃; 5,3 g l-1 NH₄NO₃; 10,3 g l-1 (NH₄)₂SO₂.

Prima dell’esposizione, le piante devono avere almeno cinque foglie, la cui lunghezza superi i 15 cm dall’estremità distale della foglia fino all’attaccatura del picciolo sullo stelo. La foglia più giovane, superiore o uguale a 15 cm di lunghezza, è marcata con filo di lana colorato in modo da individuare, in fase di campionamento, le foglie sviluppatesi in seguito all’esposizione *in loco*.

5.3 Preparazione dei contenitori “a reservoir”

I contenitori detti “a reservoir” (dimensioni: 40x60x30 cm) sono realizzati con sagome di polistirolo, all’interno delle quali sono ottenute 6 cavità quadrangolari di dimensione 11,5x11,5 cm, ciascuna atta a contenere una pianta di cavolo. Le sagome di polistirolo sono sovrapposte ad una vasca in materiale plastico (60x40x12 cm), ciascuna delle quali contiene 15 litri di acqua potabile in modo da permettere l’approvvigionamento idrico passivo delle piante tramite immersione delle corde in fibra di vetro nella vasca. Ciascuna delle vasche è dotata di un foro (diametro di 1,5 cm) in modo da permettere la fuoriuscita di eventuale eccesso di acque meteoriche ed evitare l’instaurarsi di anossia dell’apparato radicale. Le vasche sono adagate

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	15/36

su di un apposito supporto sopraelevato dalla superficie del terreno per circa 130 cm in un luogo privo da qualsiasi copertura. Ogni stazione ospita, quindi, tre *reservoir*, ciascuno dei quali contiene tre piante di cavolo per un totale di nove piante per ogni stazione di biomonitoraggio. Le cavità non utilizzate sono ricoperte da lamine di PVC di colore nero, per limitare l'evaporazione e l'ingresso di materiale estraneo, di natura biologica o inorganica. L'ingombro finale del *kit* è quantificato in 40x130x170 cm.

5.4 Allestimento delle stazioni e sopralluoghi periodici

In questa fase le piante di cavolo sono adagiate negli alloggiamenti lasciati liberi dal film plastico in modo che ogni pianta abbia sufficiente spazio di svilupparsi senza che le foglie in crescita si sovrappongano a quelle della pianta vicina. La foglia più giovane che, sviluppata a tale data ed avente lunghezza superiore o uguale a 15 cm dall'estremità distale all'attaccatura del picciolo sul fusto, è marcata con filo di lana colorato in modo da individuare, in fase di campionamento, le foglie sviluppatesi in seguito all'esposizione *in loco*. Le piante sono, infine, numerate progressivamente in modo da poter ascrivere dopo campionamento ogni singola pianta alla relativa stazione di provenienza. L'allestimento deve essere adagiato in spazi areati e privi di qualsiasi copertura, in accordo con le linee guida della norma VDI 3957/Part 3.

In fase di progettazione dell'indagine è stato previsto lo svolgimento di sopralluoghi periodici (a cadenza quindicinale) a tutte le stazioni della rete da parte di personale esperto. Lo scopo dei sopralluoghi è quello di verificare il grado di crescita e lo stato di salute delle piante, provvedere ad eventuale riempimento delle vasche di suzione in caso di elevata traspirazione (strettamente dipendente dalle condizioni climatiche del periodo) e scongiurare eventuali problemi come danni accidentali/vandalici arrecati all'allestimento.

5.5 Raccolta dei campioni

Dopo 60 giorni di esposizione le piante di brassica esposte nelle 24 stazioni devono essere campionate *in loco*. Le piante devono essere recise all'altezza del colletto e di ognuna sono prelevate sette foglie (prive del picciolo) sviluppatesi al di sopra del nastro di lana utilizzato come *marker* della prima foglia completamente espansa (lunghezza superiore ai 15 cm) presente alla data di posizionamento delle stazioni. Questo passaggio rappresenta una modifica alla VDI 3957 (2000, 2008), che contempla il campionamento delle due foglie al di sotto del nastro e delle cinque sviluppate al di sopra del *marker*. Questo perchè, in aree mediterranee come nel presente studio, dopo 60 giorni di esposizione le foglie posizionate al di sotto della foglia segnata (e talvolta la foglia segnata stessa) possono risultare ingiallite, senescenti e perfino necrotiche. Questo è da ritenere imputabile ad un ciclo vitale della pianta più spedito in condizioni climatiche più miti (come quelle della Puglia) rispetto a quelle continentali tedesche, condizioni per le quali il protocollo è stato validato. Le foglie di ciascuna

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	16/36

pianta sono prontamente racchiuse in un foglio di alluminio e quest'ultimo catalogato col numero identificativo del soggetto di provenienza. Ogni campione è immediatamente collocato in celle refrigerate portatili e mantenute a temperature inferiori a 10 °C, come descritto dalla VDI 3957 (2000, 2008), fino al momento dell'arrivo in laboratorio.

5.6 Preparazione dei campioni per le analisi

Una volta in laboratorio, le foglie di ogni pianta sono private della nervatura centrale con una lama affilata. Qualora sia necessario, eventuali impurità superficiali (come aghi di pino o foglie secche) sono asportati con un panno umido. Le foglie delle piante provenienti da ogni stazione sono unite in un unico contenitore, dal quale (dopo opportuno mescolamento) sono prelevate, per ogni stazione, tre repliche di materiale vegetale di circa 200 g ciascuna (in peso fresco). I campioni sono poi prontamente stoccati a -20 °C fino al loro conferimento presso i laboratori di analisi.

5.7 Analisi chimiche

Le procedure analitiche sono dettagliate nel Capitolo 7.

6. Procedura operativa per la rete di rilevamento di IPA e PCDD/F negli aghi di pino

6.1 Introduzione

Come richiesto espressamente da ARPA Puglia durante la riunione del 21 gennaio 2014, l'uso degli aghi di pino è proposto in affiancamento delle brassicacee e può essere considerato un metodo complementare per ottenere informazioni aggiuntive. Riguardo all'adozione di questa metodica, come premesso in fase di progettazione, occorre fare alcune precisazioni, in modo da evidenziare potenzialità e limiti del metodo. In particolare, l'utilizzo degli aghi di pino presenta le seguenti potenzialità:

- utilizzo di esemplari di pini autoctoni già presenti sul territorio e immediatamente disponibili per la raccolta degli aghi;
- gli aghi di varie specie di pini sono tra le matrici più utilizzate per questo tipo di inquinanti (Holoubek et al. 2000; Piccardo et al. 2005; Augusto et al. 2010; Ratola et al. 2011; Rodriguez et al. 2012).
- esposizione all'aria per un periodo di tempo più lungo rispetto alle piante di cavolo. Infatti, mentre queste ultime sono esposte all'aria ambiente per due mesi, gli aghi di pino possono essere rappresentativi di periodi di tempo più lunghi (variabili da 1 a 2-5 anni, a seconda della specie di pino). In questo caso è stato scelto di selezionare gli

Progetto <i>Project</i>	Responsabile <i>Responsible</i>	Documento <i>Document</i>	Avanzamento <i>Progress</i>	Data <i>Date</i>	Stato <i>Status</i>	Pagina/ <i>Page</i>
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	17/36

aghi di un anno di età per i seguenti motivi principali: i) perchè lo scopo del lavoro è quello di 'fotografare' la situazione attuale dell'inquinamento atmosferico, che potrà essere confrontata con i risultati delle indagini future, condotte con stessa stagionalità e tempistica, ii) perchè studi di letteratura dimostrano che gli aghi di un anno sono i più adatti (cfr. Piccardo et al. 2005), iii) perchè la maggior parte degli studi di letteratura ha preso in considerazione aghi di un anno di età (Hanari et al. 2004; Piccardo et al. 2005; Grimalt e van Drooge 2006; Rappolder et al. 2007; Wyrzykowska et al. 2007; Ratola et al. 2011, 2012; Rodriguez et al. 2012).

I limiti specifici dell'applicazione del metodo contestualizzati ai fini del presente studio, sono invece i seguenti:

- sebbene siano disponibili molti esemplari di pini autoctoni sul territorio, la loro distribuzione risulta irregolare e concentrata nelle aree più vicine alla costa;
- sul territorio sono presenti principalmente tre specie di pini: *Pinus halepensis* Mill. (Pino d'Aleppo), *Pinus pinaster* Aiton (Pino marittimo), *Pinus pinea* L. (Pino domestico). Tuttavia, come evidenziato da alcuni studi di letteratura (Piccardo et al. 2005; Ratola et al. 2011), specie diverse accumulano in maniera diversa, per cui l'utilizzo di più specie di *Pinus* nella stessa area di studio renderebbe i dati di difficile comparazione e interpretazione;
- non esiste ad oggi un metodo standardizzato riconosciuto a livello nazionale o internazionale a cui fare riferimento. Si è provveduto perciò a sviluppare internamente un metodo standard, facendo riferimento alle informazioni di letteratura;
- le diverse età degli aghi di pino (>0-5 anni) possono influenzare le concentrazioni degli inquinanti accumulati (Piccardo et al. 2005). In questo caso il metodo è stato standardizzato mediante la raccolta di aghi della stessa età (aghi di un anno), in linea con la maggior parte degli studi di letteratura (Hanari et al. 2004; Piccardo et al. 2005; Grimalt e van Drooge 2006; Rappolder et al. 2007; Wyrzykowska et al. 2007; Ratola et al. 2011, 2012; Rodriguez et al. 2012). Questo accorgimento, oltre a garantire una maggiore confrontabilità con i dati di letteratura, segue le indicazioni di Piccardo et al. (2005) riguardo a questi aspetti metodologici. Infatti, questi Autori hanno analizzato le concentrazioni di nove IPA in aghi di pino di età diversa campionati su due specie arboree (*Pinus nigra* e *P. pinaster*) in uno studio condotto lungo un transetto dall'area suburbana a quella urbana di Genova. I risultati hanno evidenziato una variabilità molto importante legata all'età dell'ago, con gli aghi più vecchi (18 e 30 mesi) che mostravano un minor tasso di accumulo rispetto agli aghi di un anno di età. Come discusso nell'articolo, questi risultati sarebbero influenzati da fattori legati alla senescenza degli aghi, che comporta una riduzione dello strato di cere epicuticolari e un conseguente aumento nella sensibilità nei confronti di attacchi da parte di patogeni (funghi, muffe,

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	18/36

insetti). Per questo motivo, Piccardo et al. (2005) suggeriscono di utilizzare aghi di un anno di età per mappare e comparare dati su aree ampie.

I dati ottenuti dall'analisi degli aghi di pino non sono quindi direttamente confrontabili con i dati ottenuti dalle foglie di cavolo. Infatti, si tratta di matrici vegetali diverse, caratterizzate da diversa capacità di accumulo (basti pensare per esempio alla diversa ampiezza della superficie di scambio con l'atmosfera). Inoltre, i due biomonitors sono esposti all'aria ambiente per periodi di diversa durata: mentre gli aghi di pino di un anno di età hanno avuto appunto un anno di tempo per accumulare i composti oggetto dello studio, le piante di brassica sono state esposte per due mesi, come prevede il metodo VDI 3957 (2000, 2008). Sulla base di queste considerazioni si consiglia di utilizzare il metodo degli aghi di pino in affiancamento all'esposizione di Brassica, considerando tuttavia quest'ultimo come metodo 'principale' della rete integrata.

Per la selezione delle stazioni è stato adottato lo stesso schema proposto per il cavolo. Per questo motivo, sono stati effettuati dei sopralluoghi (nel corso dell'indagine condotta nel periodo giugno-settembre 2014) per valutare la presenza di esemplari disponibili per la raccolta di aghi. In particolare, come emerso dai sopralluoghi effettuati, in 17 delle 24 stazioni considerate sono presenti tre specie di pino, il pino d'Aleppo, il pino marittimo e il pino domestico o da pinoli.

Sulla base dei risultati di questo sopralluogo e di quanto riportato sopra riguardo alla necessità di utilizzare una sola specie, si è scelto di selezionare il pino d'Aleppo. Questa specie, infatti, è la più diffusa nell'ambito delle 24 stazioni della rete, con 11 stazioni, di cui 5 nei pressi di centraline di rilevamento della qualità dell'aria e 7 in aree di prescrizione.

La rete risulta perciò costituita da 11 stazioni (3 repliche per stazione).

6.2 Raccolta campioni di aghi di pino

I campioni di aghi di pino devono essere raccolti sulla chioma di esemplari di *Pinus halepensis* facendo riferimento ai metodi di campionamento adottati dalla rete di monitoraggio delle foreste europee ICP Forests (manuale Parte XII; Rautio et al. 2010; <http://icp-forests.net/page/icp-forests-manual>). Per ciascuna stazione sono selezionati 3 alberi. I rami e gli aghi devono essere campionati con i seguenti criteri:

- selezione random di quattro direzioni sulla chioma dell'albero in corrispondenza delle quali selezionare i rami da campionare;
- raccolta di rami esterni esposti alla luce e posizionati nella parte centrale della chioma;
- selezione degli aghi di un anno di età (non dell'anno corrente; cfr. par. 6.1).

Per ciascun albero sono campionate 4 aliquote che – mischiate insieme – vanno a costituire il campione composito da analizzare. Si ottengono perciò tre campioni per stazione. Gli aghi sono trasportati a T<10 °C all'interno di fogli di carta di alluminio a loro volta contenuti all'interno di

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	19/36

buste di carta e di polietilene. I campioni sono etichettati con il codice della stazione e con la data della raccolta. Durante il periodo di raccolta i campioni sono conservati in cella frigorifera e in apposite ghiacciaie elettriche con accumulatori di freddo. Successivamente sono trasportati al laboratorio in tempi brevi, dove sono conservati in congelatore in attesa dello svolgimento delle analisi chimiche (cfr. Capitolo 7).

6.3 Analisi chimiche

Le procedure analitiche sono dettagliate nel Capitolo 7.

7. Procedure analitiche

7.1 Bioaccumulo nei licheni

I campioni di lichene sono sottoposti alle fasi di omogeneizzazione, mineralizzazione e lettura allo spettrofotometro.

Omogeneizzazione e mineralizzazione: i campioni sono immersi in azoto liquido e omogeneizzati a mano all'interno di pestelli in ceramica, sottoposti a un accurato ciclo di lavaggio con acqua deionizzata tra un campione e l'altro. I campioni omogeneizzati sono poi sottoposti a mineralizzazione con l'aggiunta di acqua regia (HCl e HNO₃). Ad ogni ciclo di mineralizzazione sono mineralizzati anche un bianco coerente e un campione di materiale certificato (IAEA-336). A fine mineralizzazione, i campioni di bianco e di materiale standard sono portati ad ugual volume dei campioni e processati come campione vero e proprio. Il bianco è usato per valutare la pulizia dei contenitori monouso utilizzati per la mineralizzazione, mentre il materiale standard certificato è usato per valutare il recupero per ognuno degli elementi certificati per la matrice studiata.

Lettura allo spettrofotometro (ICP-MS): i campioni sono analizzati tramite spettrofotometria di massa di emissione con sorgente al plasma (ICP-MS). Sono analizzati i 18 elementi previsti in fase di progettazione della rete (Be, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Te, Ba, Hg, Tl, Pb). Tutte le analisi sono condotte in doppio (41 stazioni; 3 repliche a stazione). Per tutti i set di mineralizzazione viene analizzato un bianco di processo e un materiale certificato (IAEA-336), per la verifica contemporanea della pulizia del ciclo analitico e del recupero per ogni metallo nella matrice voluta. Per i metalli con valore certificato deve essere valutata la ripetibilità di minimo sei prove confrontando ogni valore con l'intervallo di confidenza dato dal materiale certificato stesso; per i metalli presenti ma non certificati viene valutata la ripetibilità e quindi preso in considerazione l'intervallo di confidenza del metallo con la concentrazione nativa più prossima. Per i metalli non presenti nel materiale certificato viene eseguito un accrescimento

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	20/36

tale da dare dei valori ben discriminabili. Dopo questa fase preliminare si valuta l'intervallo di concentrazione accettabile per i metalli di interesse analitico per la matrice presa in considerazione.

7.1.1 Qualità dei dati: analisi del materiale standard

Per controllare l'accuratezza della digestione e delle procedure analitiche, viene utilizzato il materiale standard certificato IAEA-336 lichen, estratto dalla specie fruticosa *Evernia prunastri* (Heller-Zeisler et al. 1999), commercializzato dall'International Atomic Energy Agency (IAEA). In particolare, campioni dello standard sono mineralizzati insieme ai campioni di licheni per ciascun ciclo di mineralizzazione e letti allo spettrofotometro. I risultati delle letture sono usati per valutare il recupero per ognuno degli elementi certificati per la matrice studiata.

I valori di recupero delle concentrazioni di tre elementi (Be, Te e Tl) non riportati nel materiale standard sono invece ottenuti mediante un arricchimento della matrice con quantità note di questi elementi.

7.1.2 Valori di accumulo nei campioni esposti

I valori dei campioni di controllo, rappresentati da tre dei 260 talli lichenici raccolti nell'area remota, sono confrontati con la scala di naturalità/alterazione proposta da ANPA (Nimis e Bargagli 1999) per avere un riferimento sull'effettivo significato di *background* delle concentrazioni degli elementi prima di procedere con l'esposizione. Questa scala è stata elaborata sulla base di un set di campioni lichenici raccolti *in situ* in tutta Italia.

I valori di concentrazione ottenuti per i campioni esposti per tre mesi in corrispondenza delle stazioni della rete sono interpretati facendo riferimento alla differenza tra la concentrazione rilevata nel campione esposto e la concentrazione nel campione di controllo, che corrisponde perciò al valore accumulato nel periodo di esposizione:

$$\text{Accumulo} = [E_x] - [C_x]$$

in cui:

[E] = concentrazione dell'elemento x nel campione esposto in corrispondenza della stazione;

[C] = concentrazione dell'elemento x nel campione di controllo, non esposto.

Pur non consentendo un confronto diretto tra elementi che presentano concentrazioni con ordini di grandezza diversi, questo metodo di elaborazione e interpretazione dei dati garantisce la comparabilità dei risultati di indagini ripetute nel tempo. Occorre infatti considerare che, nell'ambito di programmi di biomonitoraggio su più anni ed in cui i campioni di controllo devono essere raccolti freschi e analizzati all'inizio di ciascuna indagine, sono sempre possibili concentrazioni diverse nei campioni di controllo tra un'indagine e l'altra, anche se raccolti nella

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	21/36

stessa area remota. Nell'ambito di studi simili, per ovviare a questo inconveniente è stato proposto (Fрати et al. 2005) di utilizzare il rapporto tra campioni esposti e campioni di controllo come parametro di riferimento per valutare l'andamento nel tempo dell'accumulo di ciascun elemento analizzato (EC ratio). Una procedura simile è stata utilizzata in diversi lavori di letteratura (per es. Guidotti et al., 2009; Guttová et al. 2011; Malaspina et al. 2014a, 2014b; Corapi et al. 2014; Protano et al. 2014).

7.2 Bioaccumulo in aghi di pino e brassica

Per ciascun campione sono analizzati, come da proposta presentata al Tavolo Tecnico ISPRA (Brunialti et al. 2014), i seguenti composti:

- 23 IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici) complessivi, compresi i 16 IPA prioritari secondo l'EPA (Environmental Protection Agency) degli Stati Uniti.
- 17 congeneri di PCDD, PCDF altamente tossici.
- 12 congeneri di PCB ad azione diossina-simile (PCB_{DL}).
- 6 congeneri di PCB cosiddetti indicatori, *markers* (PCB_{MK}).
- 11 congeneri di PCB a maggiore interesse espositivo per le matrici biologiche Non Diossina Simili (PCB_{NDL}).

La Tabella 7.1 riporta l'elenco completo dei composti con il riferimento al metodo standardizzato di analisi.

Per i dettagli tecnici in merito alla determinazione quantitativa di IPA e PCB si rimanda alla relazione del laboratorio di analisi CAIM riportata in Annesso D1 della relazione tecnica (Brunialti et al. 2015), in cui sono specificate le fasi di estrazione e purificazione, determinazione strumentale, controllo di qualità del dato analitico, determinazione del limite di quantificazione e calcolo dei valori di tossicità equivalente (TEQ) per i PCB_{DL}. Lo stesso annesso riporta anche la relazione del laboratorio di analisi Eco-Research con i dettagli tecnici in merito alla determinazione quantitativa di diossine e furani.

Tab. 7.1 – Elenco dei composti analizzati per ciascun campione vegetale e di suolo/lettiera.

Composti		Metodo
IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici)		
Naftalene Fluorene Fenantrene Antracene Pirene Benzo(a)pirene Crisene Benzo(k)fluorantene Dibenzo(a,h)Antracene Benzo (g,h,i)Perilene Indeno(1,2,3-c,d)Pirene Benzo (a) antracene	Benzo (e) pirene Benzo (b) fluorantene Benzo (i) fluorantene Dibenzo (a,i) pirene Dibenzo (a,h) pirene Dibenzo (a,l) pirene Dibenzo (a,e) pirene Acenaftene Acenaftilene Perilene Fluorantene	EPA 8270D 2007 + EPA 3546 2007 (aghi di pino) UNI EN 15662:2009 (brassica)

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	22/36

DIOSSINE E FURANI (ALTA RISOLUZIONE)		
DIBENZO-DIOSSINE (PCDD) 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PeCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD	DIBENZO-FURANI (PCDF) 2,3,7,8-TCDF 1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,4,7,8-PeCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OCDF	EPA 1613B 1994 + UNEP/POPS/COP.3/INF/ 27 11/04/2007 (aghi di pino e brassica)
PCB (CONGENERI)		
<i>PCB Diossina Simili (DL)</i> 3,3',4,4' TETRA-CB (PCB 77) 3,4,4',5 TETRA-CB (PCB 81) 3,3',4,4',5 PENTA-CB (PCB 126) 3,3',4,4',5,5' ESA-CB (PCB 169) 2,3,3',4,4' PENTA-CB (PCB 105) 2,3,4,4',5 PENTA-CB (PCB 114) 2,3',4,4',5 PENTA-CB (PCB 118) 2',3,4,4',5 PENTA-CB (PCB 123) 2,3,3',4,4',5 ESA-CB (PCB 156) 2,3,3',4,4',5' ESA-CB (PCB 157) 2,3',4,4',5,5' ESA-CB (PCB 167) 2,3,3',4,4',5,5' EPTA-CB (PCB 189)	<i>PCB Markers (MK)</i> 2,4,4' TRI-CB (PCB 28+31) 2,2',5,5' TETRA-CB (PCB 52) 2,2',4,5,5' PENTA-CB (PCB 101) 2,2',3,4,4',5' ESA-CB (PCB 138) 2,2',4,4',5,5' ESA-CB (PCB 153) 2,2',3,4,4',5,5' EPTA-CB (PCB 180) <i>PCB Non Diossina Simili (NDL)</i> 2,2',3,5',6 PENTA-CB (PCB 95) 2,2',4,4',5 PENTA-CB (PCB 99) 2,3,3',4',6 PENTA-CB (PCB 110) 2,2',3,3',4,4' ESA-CB (PCB 128) 2,2',3,4',5,5' ESA-CB (PCB 146) 2,2',3,4',5,6 ESA-CB (PCB 149) 2,2',3,5,5',6 ESA-CB (PCB 151) 2,2',3,3',4,4',5 EPTA-CB (PCB 170) 2,2',3,3',4,5,6' EPTA-CB (PCB 177) 2,2',3,4,4',5,6 EPTA-CB (PCB 183) 2,2',3,4',5,5,6 EPTA-CB (PCB 187)	EPA 8270D 2007 + EPA 3546 2007 (aghi di pino) UNI EN 15662:2009 (brassica)

7.2.1 Risposta alle osservazioni di ARPA Puglia sui limiti di quantificazione (LOQ)

Fatto salvo che i LOQ sinora ottenuti sono in linea con quanto richiesto dai criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi negli alimenti e per le indagini ambientali (cfr. Tab 7.1 e Annessi 1 e 2), per venire incontro alle osservazioni di ARPA Puglia (Verbale di Esecuzione Visita Ispettiva Ordinaria Parte II del DPCM 14-03-14 in riferimento alla Prescrizione 93 DVA-DEC_2012-00547, per le analisi di IPA, PCB e PCDD/F sugli aghi di pino e foglie di cavolo) nelle campagne future si prevede di ridurre il limite di quantificazione degli analiti oggetto dello studio adottando i seguenti accorgimenti:

- (i) migliorare l'efficacia del processo di purificazione degli estratti;
- (ii) aumentare la sensibilità strumentale;
- (iii) aumentare la quantità di campione processata.

In particolare, si prevede di:

- ridurre a circa 1/10 il limite di quantificazione di ogni PCB;
- ridurre a circa 1/4 il limite di quantificazione di ogni IPA;

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	23/36

- ridurre a circa 1/5 il limite di quantificazione di ogni Dibenzo-p-diossina e di ogni Dibenzofurano.

Si rimanda agli Annessi 1 e 2 per le note preparate in merito dai due laboratori di analisi coinvolti nello studio: Centro di analisi CAIM srl e laboratorio Eco-Research srl.

8. Tempistiche della rete

Secondo quanto previsto in fase di progettazione della rete (Brunialti et al. 2013) e discusso durante i lavori del Tavolo Tecnico ISPRA, le attività di biomonitoraggio ambientale verranno effettuate in quattro campagne di misure, ciascuna a cadenza annuale, da condursi nel periodo di tempo compreso tra il 2014 e il 2022 (Tabella 8.1).

Per quanto concerne lo sviluppo della singola indagine annuale occorre considerare che le metodologie richieste dalla Prescrizione n. 093 e dal tavolo Tecnico ISPRA (bioindicazione con licheni, bioaccumulo con licheni, bioindicazione con piante vascolari, bioaccumulo di POPs in aghi di pino e brassica) presentano caratteristiche applicative diverse. Si tratta in buona sostanza di indagini che, anche se insistenti sulla stessa zona, necessitano di tecniche e tempi diversi.

In generale, si può considerare la seguente tempistica e stagionalità:

- bioindicazione con licheni: non è legata alla stagionalità per cui è possibile iniziare l'indagine in qualsiasi periodo dell'anno. Tuttavia, per la confrontabilità dei dati è importante che le varie indagini siano svolte nello stesso periodo dell'anno. Occorrono circa tre mesi complessivi per il rilevamento, cinque mesi per l'elaborazione dei dati e la stesura del report tecnico.
- bioaccumulo mediante trapianti di licheni: questa indagine deve essere prevista per il periodo primaverile-estivo in modo che tutti gli alberi su cui verranno esposti i campioni lichenici abbiano le foglie e quindi assicurino condizioni simili di ombreggiamento fra le stazioni. I campioni dovranno essere raccolti in un'area non contaminata e preparati per l'esposizione (questa fase potrebbe richiedere due mesi), dovranno essere esposti per tre mesi nell'area di studio, serviranno circa tre mesi per la preparazione e l'analisi dei campioni, quattro mesi per l'elaborazione dei dati e la stesura del report tecnico.
- bioindicazione dell'ozono con piante di tabacco: essendo l'ozono un contaminante tipico del periodo tardo-primaverile estivo, l'esposizione delle piante di tabacco deve necessariamente svolgersi nello stesso periodo e va pianificata e decisa in anticipo per la produzione dei bioindicatori. L'esposizione va pianificata per il periodo da maggio a settembre, con rilevamenti settimanali. A questa fase seguiranno l'elaborazione dei dati e la stesura del report tecnico.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	24/36

- bioaccumulo mediante piante di cavolo: l'esposizione delle piante di cavoli deve essere effettuata nel periodo invernale a pianificata e decisa in anticipo per la produzione dei bioindicatori. Le piante devono essere esposte per due mesi, con sopralluoghi quindicinali per controllarne lo stato di salute. Serviranno circa due mesi per la preparazione e l'analisi dei campioni, quattro mesi per l'elaborazione dei dati e la stesura del report tecnico. Anche in questo caso, per la confrontabilità dei dati è importante che le varie indagini siano svolte nello stesso periodo dell'anno.
- bioaccumulo mediante aghi di pino: la raccolta degli aghi di pino conviene che coincida il più possibile con la raccolta dei campioni di cavoli. Serviranno circa due mesi per la preparazione e l'analisi dei campioni, quattro mesi per l'elaborazione dei dati e la stesura del report tecnico.

Per quanto riguarda la cadenza delle indagini della rete da condurre nel medio periodo al fine di valutare gli effetti delle attività previste dalle prescrizioni dell'AIA (ante e post prescrizioni), sono state previste quattro indagini sulla rete secondo lo schema riportato in Tabella 8.1. Per avere un quadro esaustivo della situazione della qualità dell'aria prima dell'attuazione delle attività previste dalle prescrizioni dell'A.I.A. (fase ante-prescrizioni; periodo 2014-2018) sono state previste due indagini per la rete di rilevamento di licheni e tabacco (anni 2014-2015 e 2016-2017), e altrettante per la rete di rilevamento di IPA, PCB e PCDD/F in aghi di pino e brassica (anni 2015-2016 e 2017-2018). Al termine di queste attività è prevista l'elaborazione integrata dei risultati relativi alla fase ante-prescrizioni.

Per avere poi un quadro della situazione dopo l'attuazione delle attività A.I.A. è stata prevista la ripetizione di altrettante indagini seguendo la stessa cadenza temporale (2018-2020; 2020-2022). Anche in questo caso, è prevista una fase finale di elaborazione integrata dei risultati.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	25/36

Tab. 8.1 – Tempistiche delle attività della rete di biomonitoraggio.

Anni		Indice di Biodiversità Lichenica	Bioaccumulo licheni	Bioindicazione ozono	IPA, PCDD/F e PCB cavoli	IPA, PCDD/F e PCB aghi di pino	Elaborazione integrata dati
Ante prescrizioni							
I indagine	2014-2015	■	■	■			
	2015-2016				■	■	
II indagine	2016-2017	■	■	■			
	2017-2018				■	■	
Confronto risultati	2017-2018						■
Post prescrizioni							
I indagine	2018-2019	■	■	■			
	2019-2020				■	■	
II indagine	2020-2021	■	■	■			
	2021-2022				■	■	
Confronto risultati	2021-2022						■

9. Soggetti coinvolti

Lo studio è stato e sarà svolto da un gruppo di ricercatori e professionisti esperti nel monitoraggio e biomonitoraggio ambientale e nei metodi di elaborazione statistica afferenti a TerraData (spin- off accademico dell'Università di Siena), all'Università di Pisa (Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, DiSAAA-a), all'Università di Genova (Dipartimenti DISTAV e DIFAR), all'Università di Siena (Dipartimento di Economia Politica e Statistica, DEPS), al Centro di analisi CAIM (Follonica, Grosseto) e al laboratorio Eco-Research di Bolzano, che opera su commissione CAIM. Il lavoro è stato e sarà sottoposto ad un processo di revisione scientifica da parte di un comitato interno di ricercatori e docenti appartenenti a diverse università italiane (Università di Bologna, Cagliari, Siena e Trieste). Di seguito si riporta un breve inquadramento dei ruoli ricoperti da ciascun membro del gruppo di lavoro nell'ambito delle principali attività del progetto.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	26/36

Personale afferente a TerraData (ruoli nel progetto):

- Dr. Giorgio Brunialti, PhD, biologo. Socio fondatore e Direttore Commerciale di TerraData (coordinamento del progetto tutte le sue fasi, bioindicazione mediante licheni, bioaccumulo mediante licheni, bioaccumulo mediante aghi di pino).
- Dr. Marco Ferretti, PhD, forestale. Direttore tecnico di TerraData (progettazione e supervisione scientifica del progetto).
- Dr. Valerio Amici, PhD, laurea in Geografia Applicata. Collaboratore di TerraData (bioindicazione mediante licheni, bioaccumulo mediante licheni, bioaccumulo mediante aghi di pino, elaborazioni cartografiche in ambiente GIS).
- Dr. Davide Bettini, laurea in Scienze Forestali. Collaboratore di TerraData (bioaccumulo mediante aghi di pino).
- Dr. Marco Calderisi, PhD, chimico. Socio fondatore di TerraData (analisi univariata e multivariata dei dati).
- Dr. Luisa Frati, PhD, naturalista. Socio fondatore e presidente di TerraData (bioindicazione mediante licheni, bioaccumulo mediante licheni e aghi di pino).
- Dr. Paolo Giordani, PhD, biologo. Collaboratore di TerraData (indagine 2014: bioindicazione mediante licheni, bioaccumulo mediante licheni). Attualmente ricercatore presso l'Università di Genova.

Personale afferente all'Università di Pisa (biomonitoraggio dell'ozono e bioaccumulo mediante piante di brassica):

- Prof. Cristina Nali, PhD, Professore Associato di Patologia Vegetale presso l'Università di Pisa.
- Prof. Giacomo Lorenzini, Professore Ordinario di Patologia Vegetale presso l'Università di Pisa.
- Dr. Elisa Pellegrini, PhD, laurea in Gestione e tutela dell'ambiente forestale. Ricercatore presso il DISAAA-a dell'Università di Pisa (Biomonitoraggio dell'ozono).
- Dr. Lorenzo Cotrozzi, laurea magistrale in Progettazione e gestione del verde urbano e del paesaggio. Dottorando presso il DISAAA-a dell'Università di Pisa.
- Dr. Alessandra Campanella, laurea in Scienze Agrarie. Borsista presso il DISAAA-a dell'Università di Pisa.
- Dr. Marco Landi, PhD, laurea in Biotecnologie vegetali e microbiche. Borsista presso il DISAAA-a dell'Università di Pisa.

Personale afferente all'Università di Genova (bioaccumulo mediante licheni):

- Prof. Paolo Modenesi, biologo. Professore Associato di Botanica Generale presso l'Università di Genova (indagine 2014). Attualmente in pensione.
- Dr. Paola Malaspina, biologa. Assegnista e dottorando di ricerca presso l'Università di Genova.
- Dr. Paolo Giordani, PhD, biologo. Ricercatore presso l'Università di Genova (bioaccumulo mediante licheni).

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	27/36

Personale afferente all'Università di Siena (numerosità campionarie, confronto Impatto/Controllo biodiversità e bioaccumulo):

Prof. Lorenzo Fattorini, Professore Ordinario di Statistica presso l'Università di Siena.

Personale afferente al centro di analisi CAIM (analisi chimiche licheni, brassica, aghi di pino):

Dr. Graziana Grassini, biologa. Titolare del centro di analisi CAIM srl.

Dr. Massimiliano Carrara, laurea in Chimica Industriale. Direttore del centro di analisi CAIM srl.

Dr. Marco Piram, laurea in Chimica Industriale. Responsabile ricerca e sviluppo, Responsabile settore Agroalimentare presso il centro di analisi CAIM srl.

Sig. Costantino Scola, perito chimico. Tecnico specializzato presso il centro di analisi CAIM srl.

Dr. Bruno Silverio, laurea in Chimica Analitica. Tecnico presso il centro di analisi CAIM srl.

Personale afferente al laboratorio Eco-Research (analisi chimiche diossine e furani in brassica e aghi di pino):

Dr. Werner Tirlor, laurea in Chimica. Direttore.

Dr. Karl Mair, laurea in Chimica. Tecnico responsabile laboratorio.

Sig. Massimo Donegà, perito chimico. Responsabile inorganica (accettazione campioni e applicazione metodi di analisi).

Sig. Giulio Voto, perito chimico. Responsabile organica (quantificazione campioni).

Dr. Roberto Pacilio, Diploma di laurea in sicurezza ambienti di lavoro. Tecnico di Laboratorio (trattamento campioni).

Sig. Manuel Targa, diploma. Tecnico di Laboratorio (trattamento campioni). Sig. Daniela Sbironi, impiegata (accettazione e stampe RDP).

Comitato interno di revisione scientifica (report relativo a indagine licheni e tabacco):

Dr. Giovanni Bacaro, PhD, Professore Associato di Botanica Ambientale e Applicata presso l'Università di Trieste. Esperto in ecologia delle comunità vegetali e analisi dati.

Prof. Alessandro Chiarucci, PhD, Professore Ordinario di Ecologia della Vegetazione e Conservazione Biologica presso l'Università di Bologna. Esperto di ecologia delle comunità vegetali, biogeografia, metodi per la quantificazione della biodiversità.

Dr. Simona Maccherini, PhD, Ricercatore in Botanica ambientale e applicata presso l'Università di Siena. Esperta di ecologia vegetale.

Dr. Michela Marignani, PhD, Ricercatore di Botanica ambientale e applicata presso l'Università di Cagliari. Esperto di ecologia vegetale ed ecologia del paesaggio.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	28/36

10. Bibliografia essenziale

- ANPA, 1999. Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. ANPA Atti 2/1999: 337.
- ANPA, 2001. I.B.L. Indice di biodiversità lichenica. ANPA Manuali e Linee guida 2/2001: 185.
- APAT, 2006. Diossine Furani e PCB. APAT, Roma, 74 pp.
- ARPA Puglia 2012a. Stima modellistica della diffusione degli inquinanti primari nell'area di Taranto in due periodi dell'anno 2007 confronto con lo studio ISPESL. Relazione tecnica, 96 pp.
- Asta J., Erhardt W., Ferretti M., Fornasier F., Kirschbaum U., Nimis P.L., Purvis O.W., Pirintsos S., Scheidegger C., Van Haluwyn C., Wirth V., 2002. Mapping Lichen Diversity as an Indicator of Environmental Quality. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.). *Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 273-279.
- Augusto S. Máguas C., Matos J., Pereira M.J., Branquinho C., 2010. Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: A comparison with soil, air and pine needles. *Environmental Pollution* 158: 483-489.
- Barkman, J.J. 1958. *Phytosociology and ecology of crypto-gamic Epiphytes*. Van Gorcum, Assen, NL.
- Brunialti G., Frati L., 2007. Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: a retrospective study over a 7-year time span. *The Science of the Total Environment* 387: 289-300.
- Brunialti G., Frati L., 2014. Bioaccumulation with lichens: the Italian experience. *International Journal of Environmental Studies* 71: 15-26.
- Brunialti G., Frati L., Incerti G., Rizzi G., Vinci M., Giordani P., 2009. Lichen Biomonitoring of air pollution: issues for applications in complex environments. In: Romano, G.C., Conti, A.G. (Eds.), *Air Quality in the 21st Century*, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Brunialti G., Frati F., Nali C., Ferretti M., 2014. Proposta di rilevamento della presenza di IPA, diossine e furani nei tessuti vegetali da inserire nella rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. TDe P 2014/11, 12 pp.
- Brunialti G., Amici V., Cotrozzi L., Frati L., Giordani P., Lorenzini G., Nali C., Pellegrini E., Ferretti M., 2013. Progettazione di una rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. Rapporto tecnico TDe 70-2013/05, V1 R2, 96 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati).
- Brunialti G., Frati L., Amici V., Calderisi M., Cotrozzi L., Giordani P., Lorenzini G., Nali C., Pellegrini E., Ferretti M., 2015. Rilevamento della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. Monitoraggio anno 2014. Rapporto tecnico TDe 90-2015/5, V1 R1, 118 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati).

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	29/36

- Brunialti G., Frati L., Nali C., Landi M., Pellegrini E., Calderisi M., Ferretti M., 2016. Rilevamento della presenza di PCDD/F, IPA e PCB nei tessuti vegetali nell'ambito della rete di biomonitoraggio della qualità dell'aria nelle aree limitrofe allo stabilimento ILVA di Taranto. Monitoraggio anno 2015. Rapporto tecnico TDe R 96-2016/01 (V1 R1), 90 pp. (+ Annessi Tecnici in documenti separati).
- Castello M., Skert N., 2005. Evaluation of lichen diversity as an indicator of environmental quality in the North Adriatic submediterranean region. *The Science of the Total Environment* 336: 201-214.
- Cislaghi C., Nimis P.L., 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature* 387: 463-464.
- Corapi A., Gallo L., Nicolardi V., Lucadamo L., Loppi S., 2014. Temporal trends of element concentrations and ecophysiological parameters in the lichen *Pseudevernia furfuracea* transplanted in and around an industrial area of S Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* 186: 3149-3164.
- Cristofolini F., Cristofori A., Gottardini E., Maccherini S., Ferretti M., 2011. Constraints in the identification and interpretation of ozone as a significant predictor of effects on the supersensitive indicator *Nicotiana tabacum* Bel-W3 in biomonitoring studies. *Ecological Indicators* 11: 1065-1073.
- Ferretti M., Andrei S., Caldini G., Grechi D., Mazzali C., Galanti E., Pellegrini M., 2007. Integrating monitoring networks to obtain estimates of ground-level ozone concentrations – a proof of concept in Tuscany (central Italy). *Science of the Total Environment* 396: 180- 192.
- Frati L., Brunialti G., 2006. Long-term biomonitoring with lichens: comparing data from different sampling procedures. *Environmental Monitoring and Assessment* 119: 391-404.
- Frati L., Brunialti G., Loppi S., 2005. Problems related to lichen transplants to monitor trace element deposition in repeated surveys: a case study from central Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry* 52(3): 221-230.
- Garty J., 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: Theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20: 309-371.
- Giordani P., 2006. Variables influencing the distribution of epiphytic lichens in heterogeneous areas: a case-study for Liguria (NW-Italy). *Journal of Vegetation Science* 17(2): 195-207.
- Giordani P., 2007. Is the diversity of epiphytic lichens a reliable indicator of air pollution? A case study from Italy. *Environmental Pollution* 146: 317-323.
- Giordani P., Brunialti G., Alleteo D., 2002. Effects of atmospheric pollution on Lichen Biodiversity (LB) in a Mediterranean region (Liguria, NW-Italy). *Environmental Pollution* 118: 53-64.
- Godinho R.M., Wolterbeek H.T., Verburg T.G., Freitas M.C., 2008. Bioaccumulation behaviour of transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata* in relation to total deposition at a polluted location in Portugal. *Environmental Pollution* 151: 318-325.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	30/36

- Godinho R.M., Wolterbeek H.T., Pinheiro M.T., Alves L.C., Verburg T.G., Freitas M.C., 2009a. Micro-scale elemental distribution in the thallus of *Flavoparmelia caperata* transplanted to polluted site. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 281: 205-210.
- Godinho R.M., Verburg T.G., Freitas M.C., Wolterbeek H.T., 2009b. Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of two species of epiphytic lichens transplanted to a polluted site in Portugal. *Environmental Pollution* 157: 102-109.
- Grimalt J.O., van Drooge B.L., 2006. Polychlorinated biphenyls in mountain pine (*Pinus uncinata*) needles from Central Pyrenean high mountains (Catalonia, Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 61-67.
- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simona C., 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography A* 985: 185-190.
- Guttová A., Lackovičová A., Pišút I., Pišút P., 2011. Decrease in air pollution load in urban environment of Bratislava (Slovakia) inferred from accumulation of metal elements in lichens. *Environ. Monit. Assess.* 182: 361-373.
- Hanari N., Horii Y., Okazawa T., Falandysz J., Bochentin I., Orlikowska A., Puzyn T., Wyrzykowska B., Yamashita N., 2004. Dioxin-like compounds in pine needles around Tokyo Bay, Japan in 1999. *Journal of Environmental Monitoring* 6: 305-312.
- Heller-Zeisler, S.F., Zeisler, R., Zeiller, E., Parr, R.M., Radecki, Z., Burns, K.I. & De Regge, P., 1999. Report on the intercomparison run for determination of trace and minor elements in lichen material IAEA-336. Vienna: International Atomic Energy Agency, p. 5.
- Herzig, R., Liebendörfer, L., Urech, M., Ammann, K., Cuecheva, M., Landolt, W., 1989. Passive biomonitoring with lichens as a part of an integrated biological measuring system for monitoring air pollution in Switzerland. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 35, 43–57.
- Hilitzer A., 1925. Étude sur la végétation épiphyte de la Bohême. Publ. Fac. Sci. Univ. Charles Prague Cisló 41: 1-200.
- Hissler C., Stille P., Krein A., Lahd Geagea M., Perrone T., Probst J-L., Hoffmann L., 2008. Identifying the origins of local atmospheric deposition in the steel industry basin of Luxembourg using the chemical and isotopic composition of the lichen *Xanthoria parietina*. *Science of the Total Environment* 405: 338-344.
- Holoubek, I., Korinek, P., Seda, Z., Schneiderova, E., Holoubkova, I., Pacl, A., Triska, J., Cudlin, P., Caslavsky, J., 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109: 283-292.
- Kantvilas G., Minchin P.R., 1989. An analysis of epiphytic lichen communities in Tasmanian cool temperate rainfor-est. *Vegetatio* 84: 99-112.
- Lorenzini G., 1999. Piante vascolari come bioindicatori della qualità dell'aria (inquinamento da ozono): proposte metodologiche. In: Piccini C., Salvati S. (eds.). Atti del Workshop 'Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale'. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA, Roma, serie Atti 2: 123-143.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	31/36

- Lorenzini G., Landi U., Loppi S., Nali C., 2003. Lichen distribution and bioindicator tobacco plants give discordant response: a case study from Italy. *Environmental Monitoring Assessment* 82: 243-64.
- Malaspina P., Tixi S., Brunialti G., Frati L., Paoli L., Giordani P., Modenesi P., Loppi S., 2014a. Biomonitoring urban air pollution using transplanted lichens: element concentrations across seasons. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (22): 12836-12842.
- Malaspina P., Giordani P., Modenesi P., Abelloschi M.L., Magi E., Soggia F., 2014b. Bioaccumulation capacity of two chemical varieties of the lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Ecological Indicators* 45: 605-610.
- McCune B., Dey J.P., Peck J.E., Cassell D., Heiman K., Will-Wolf S., Neitlich P.N., 1997. Repeatability of community data: species richness versus gradient scores in large-scale lichen studies. *Bryologist* 100: 40–46.
- Minganti V., Capelli R., Drava G., De Pellegrini R., Brunialti G., Giordani P., Modenesi P., 2003. Biomonitoring of trace metals by different species of lichens (*Parmelia*) in North-West Italy. *Journal of Atmospheric Chemistry* 45: 219-229.
- Nali C., Balducci E., Frati L., Paoli L., Loppi S., Lorenzini G., 2007. Integrated biomonitoring of air quality with plants and lichens: a case study on ambient ozone from central Italy. *Chemosphere* 67: 2169-2166.
- Nimis P.L., Bargagli R., 1999. Linee guida per l'utilizzo di licheni epifiti come bioaccumulatori di elementi in traccia. In: Piccini C., Salvati S. (eds.). Atti del Workshop 'Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale'. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA, Roma, serie Atti 2: 279-289.
- Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (eds.), 2002. Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens. Dordrecht, Kluwer Publisher.
- Piccardo M.T., Pala M., Bonaccorso B., Stella A., Redaelli A., Paola G., Valerio F., 2005. *Pinus nigra* and *Pinus pinaster* needles as passive samplers of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollution* 133: 293-301.
- Protano C., Guidotti M., Owczarek M., Fantozzi L., Blasi G., Vitali M., 2014. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Metals in Transplanted Lichen (*Pseudevernia furfuracea*) at Sites Adjacent to a Solid-waste Landfill in Central Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 471-481.
- Rappolder M., Schröter-Kermani C., Schädel S., Waller U., Körner W., 2007. Temporal trends and spatial distribution of PCDD, PCDF, and PCB in pine and spruce shoots. *Chemosphere* 67: 1887-1896.
- Ratola N., Amigo J.M., Oliveira M.S.N., Araújo R., Silva J.A., Alves A., 2011. Differences between *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* as bioindicators of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental and Experimental Botany* 72: 339-347.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	32/36

- Ratola N., Amigo J.M., Lacorte S., Barceló D., Psillakis E., Alves A., 2012. Comparison of PAH levels and sources in pine needles from Portugal, Spain and Greece. *Analytical Letters* 45: 508-525.
- Rautio P., Fürst A., Stefan K., Raitio H., Bartels U., 2010. Sampling and analysis of needles and leaves. 19 pp. Manual Part XII. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests, UNECE, ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg. ISBN: 978-3-926301-03-1. [<http://www.icp-forests.org/Manual.htm>].
- Rodriguez J.H., Wannaz E.D., Salazar M.J., Pignata M.L., Fangmeier A., Franzaring J., 2012. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the tree foliage of *Eucalyptus rostrata*, *Pinus radiata* and *Populus hybridus* in the vicinity of a large aluminium smelter in Argentina. *Atmospheric Environment* 55: 35-42.
- Sant'Anna S.M.R., Esposito M.P., Domingos M., Souza S.R., 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389-394.
- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwyn C., Déruelle S., Hazemann J.L., Soldo Y., Eybert-Bérard L., Menthonnex J.J., 1998. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. *Environmental Science and Technology* 32: 3325-3330.
- Sloof J.E., 1995. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmos. Environ.* 29, 11–20.
- Tretiach M., Carniel F.C., Loppi S., Carniel A., Bortolussi A., Mazzilis D., Del Bianco C., 2011. Lichen transplants as a suitable tool to identify mercury pollution from waste incinerators: a case study from NE Italy. *Environ. Monit. Assess.* 175, 589–600.
- Van Dobben H.F., Wolterbeek H.Th., Wamelink G.W.W., Ter Braak C.J.F., 2001. Relationship between epiphytic lichens, trace elements and gaseous atmospheric pollutants. *Environ. Pollut.* 112, 163–169.
- VDI 3957, 2000. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Standardised exposure of green cabbage. VDI, Dusseldorf, 25 pp.
- VDI 3957, 2008. Biological measuring procedures to determine and assess effects of air pollutants on plants (bioindication). Procedure for standardised exposure of curly kale. VDI, Dusseldorf, 31 pp.
- Vergé X., Chapuis A., Delpoux M., 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 118: 337-349.
- Will-Wolf S., Scheidegger C., McCune, B. 2002. Methods for monitoring biodiversity and ecosystem function. Monitoring scenarios, sampling strategies and data quality. In: Nimis, P.L., Scheidegger, C. & Wolseley, P. (eds.) *Monitoring with lichens – Monitoring lichens*, pp. 147-162. Kluwer, Dordrecht, NL.
- Wyrzykowska B., Hanari N., Orlikowska A., Bochentin I., Rostkowski P., Falandysz J., Taniyasu S., Horii Y., Jiang Q., Yamashita N., 2007. Polychlorinated biphenyls and naphthalenes in

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	33/36

pine needles and soil from Poland – Concentrations and patterns in view of long-term environmental monitoring. *Chemosphere* 67: 1877-1886.

11. Annessi

- Annesso 1: Precisazioni in merito ai LOQ nelle analisi di IPA e PCB nei tessuti vegetali.
- Annesso 2: Precisazioni in merito ai LOQ nelle analisi di PCDD/F nei tessuti vegetali.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	34/36

TerraData srl environmetrics

Spin off Università di Siena

Sede legale

Loc. Campo al Ciotolo 2 bis – 58025 Monterotondo M.mo (GR), Italia. *P IVA:* 01373460532

Sede operativa

Via L. Bardelloni 19 – 58025 Monterotondo M.mo (GR), Italia

Tel/Fax: +39 0566 916681

www.terradata.it

Nota: la riproduzione in tutto o in parte di questo documento non è mai consentita al di fuori dei termini contrattuali riportati nel documento di assegnazione.

Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	35/36

www.terradata.it



Progetto Project	Responsabile Responsible	Documento Document	Avanzamento Progress	Data Date	Stato Status	Pagina/ Page
TDe P 2016/12 [ILVA-PROCEDURA RETE]	G. Brunialti	TDe P 2016/12	V1 R0	16/09/16	Finale	36/36