

Biomonitoraggio e determinazione delle emissioni inquinanti di NO_x tramite licheni

Daniele Bellocchi, Giuseppe Battellocchi, Chiara Monachino, Stefanella Nardini, Elena Guidobaldi, Antonella Baiocchi, Luciana Billi

Istituto Omcnicomprensivo “Leonardo da Vinci” di Acquapendente (VT)

e-mail: daniele.bellocchi@gmail.com

Elisa Caprasecca, Gianluca Forti

Museo del fiore di Acquapendente (VT)

Antonella Lisi

L’Ape Regina Coop. di Acquapendente (VT)

Abstract. Lichen diversity is a good indicator of air quality and health risk and there is a strong correlation between lichen diversity and lung disease like cancer and asthma. Biological monitoring by means of lichens is a very suitable tool to assess and monitor air pollution and it has been adopted in several surveys in Italy in the last 30 years. In our school, we try to implement the traditional air pollution monitoring with an innovative – self made - analysis that is based on Kjeldahl method of nitrogen analysis for the determination of total nitrogen uptake by *Evernia prunastri* to quantify the air pollution.

The aim of this work is to assess the nitrogen oxides (NO_x) pollution in the territory of Acquapendente and to give a boost to the municipal administration and scientific community’s efforts to permanently use lichens as bioindicators and bioaccumulators in territory of north Tuscya.

Keywords: bioindicatori; bioaccumulatori; licheni; inquinamento dell’aria; biodiversità, ossidi di azoto

1. IL PROGETTO “EVERNIA”: un contributo di ricerca scientifica degli studenti di chimica al servizio dell’ambiente e del territorio

1.1 Premessa

Il presente lavoro nasce da un progetto di alternanza scuola-lavoro dell’ITT Chimico di Acquapendente, il progetto “Evernia”, iniziato con le classi quinte del triennio di specializzazione nell’a. s. 2017-2018, interrotto nel 2019-2020 causa emergenza COVID e finalmente ripreso nell’a. s. 2020-2021. Nell’articolazione “biotecnologie ambientali” del nostro Istituto chimico, da sempre vengono identificate, acquisite e approfondite le competenze relative al controllo di processi ambientali e alle relative problematiche di protezione ambientale, specialmente riferite all’impatto degli impianti e alle relative emissioni inquinanti sul territorio aquesiano. Nella nostra programmazione curricolare di indirizzo, congegnata in maniera tale da sviluppare unità di apprendimento e favorire percorsi di alternanza scuola/lavoro, cerchiamo da sempre di integrare

le conoscenze di chimica, biologia, microbiologia ed ecologia, per fornire i nostri studenti di competenze specifiche nell'analisi e controllo di matrici ambientali in relazione alle esigenze del nostro territorio, in simbiosi con la Riserva Naturale di Monte Rufeno, 2893 ettari di profondo verde in posizione nord-nord-est del territorio aquesiano.

Considerato questo contesto di riferimento, per il nostro Istituto è stato naturale, nel tempo, sviluppare competenze nel settore della prevenzione/gestione di situazioni a rischio ambientale derivanti da impianti e dalle relative emissioni inquinanti. È così che, contestualmente a percorsi di PCTO, è andato a regime un sistema di campionamento e analisi delle matrici ambientali acqua, suolo e aria rispettivamente nelle classi terze, quarte e quinte del triennio d'indirizzo.

A questo proposito, il monitoraggio dell'inquinamento atmosferico è una delle problematiche più complesse nel campo della salvaguardia ambientale e, al tempo stesso, rappresenta uno strumento indispensabile per la formulazione e l'attuazione di politiche di controllo sul territorio, destinate a promuovere lo sviluppo sostenibile e la salute dei cittadini. In tal senso si intende potenziare l'offerta formativa del nostro Istituto con progetti di biomonitoraggio per la determinazione selettiva degli ossidi di azoto (NO_x). Questo consentirà di ampliare e sviluppare una completa didattica dell'analisi strumentale e, soprattutto, di completare la piattaforma web "Scuola.Lab" [1] con i dati chimici dell'aria e con i dati dell'inquinamento da ossidi di azoto ottenuti attraverso biomonitoraggio lichenico. I risultati di questo lavoro consentiranno di tenere sotto controllo lo stato di salute del territorio e quindi del patrimonio ambientale. Ad essi verrà data ampia diffusione per favorire un'informazione consapevole e capillare della popolazione attraverso la creazione di uno sportello web sulla piattaforma, gestito direttamente dagli studenti dell'Istituto coadiuvati dai docenti.

1.2 Struttura del progetto

Il progetto "Evernia" si articola nelle seguenti fasi che hanno richiesto un totale di 43 ore:

1. lezione introduttiva sui licheni, le loro caratteristiche morfologiche e le loro suddivisioni; spiegazione di come le briofite possano essere utilizzate in base alle loro caratteristiche fisiologiche come bioaccumulatori e bioindicatori; introduzione alle metodiche di campionamento, chiavi analitiche riconoscimento licheni; spiegazione sulle modalità di campionamento dei talli lichenici per il bioaccumulo
2. lezioni preparatorie di laboratorio sul riconoscimento morfologico delle specie licheniche e sulla determinazione dell'azoto attraverso il metodo di Kjeldahl
3. individuazione dei siti idonei (stazioni 1-6) per il posizionamento del materiale lichenico
4. raccolta di 7 campioni di *Evernia prunastri* in una zona con alta naturalità (Museo del fiore, frazione Torre Alfina) e immediata determinazione su uno di essi dell'azoto di riferimento (bianco di controllo); gli altri 6 talli verranno collocati nelle 6 stazioni di rilevamento
5. preparazione di trappole licheniche ("lichen bags") a peso noto di materiale
6. posizionamento, in ognuna delle 6 stazioni precedentemente individuate, di un campione lichenico ("bag") a partire da novembre 2017
7. prelievo di una parte del campione dopo tre mesi (febbraio 2018) e successivo prelievo della parte restante dopo altri tre mesi (maggio 2018)
8. contemporaneamente *in loco*, rilievo della frequenza lichenica (IBL) nelle varie stazioni; lo scopo è quello di osservare se la ricaduta di inquinanti, dovuta ad esempio all'elevato traffico veicolare, può interferire con la quantità di specie licheniche presenti sui tronchi degli alberi
9. preparazione dei campioni in laboratorio (disidratazione, omogeneizzazione)

10. determinazione del bioaccumulo degli ossidi di azoto (NO_x) attraverso una metodica analitica sviluppata all'interno del nostro Laboratorio dell'ITT Chimico di Acquapendente
11. analisi dei risultati

1.3 L'inquinamento atmosferico da ossidi di azoto [2]

In virtù dei suoi possibili stati di ossidazione l'azoto forma ben sette ossidi e, tra questi, NO e NO_2 costituiscono la stragrande maggioranza dei così detti NO_x (90% circa il primo e 10% circa il secondo). Il primo è incolore e inodore, l'altro è bruno-rossastro con odore soffocante (la concentrazione minima per l'individuazione all'olfatto è comunque superiore a 1 ppm).

Come è noto, l'aria è composta approssimativamente per il 78% in volume da N_2 e per il 21% da O_2 . A temperatura ambiente, questi gas hanno scarsissima tendenza a reagire tra loro in conseguenza della loro inerzia chimica e dell'instabilità del prodotto (NO). L'intervento di condizioni tali da cedere sufficiente energia alla miscela, quali temperature al di sopra dei 1210 °C, ne provoca l'interazione, innescando la formazione di NO (Figura 1).

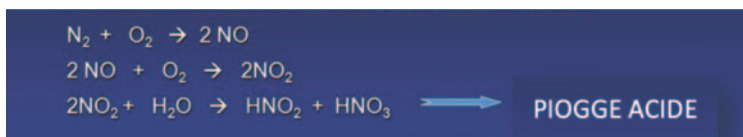


Figura 1. Formazione degli NO_x e rimozione con le piogge acide

Poiché temperature nel campo tra 1210 °C e 1765 °C sono comunemente raggiunte durante molti processi di combustione, questa reazione è un'importante sorgente di NO. L'80% di NO_x di origine non naturale deriva dalla reazione tra N_2 e O_2 dell'aria nel corso delle combustioni. Si può considerare che la formazione di essi sia un evento collaterale (sottoprodotto "involontario") di tutti i fenomeni di combustione, compresi quelli dei motori (in particolare a benzina) e degli impianti fissi (riscaldamento domestico, centrali termoelettriche, inceneritori di rifiuti, ecc.). La conseguenza ovvia è che la concentrazione di NO_x sulle città risulta 10-100 volte maggiore che al di fuori. Una volta immesso nell'atmosfera, l'NO (non solubile) può essere ossidato a NO_2 e quindi rimosso principalmente dalle precipitazioni (HNO_3) [3].

Questi composti interessano per la loro nocività nei confronti della salute umana (in particolare a livello respiratorio) e per le ripercussioni sulle piante. Più precisamente, sono tre i meccanismi di tossicità:

- a. esplicano un danno diretto solo se presenti in elevate concentrazioni, sebbene possano agire sinergicamente con altri gas;
- b. partecipano a quella catena di reazioni fotochimiche che porta alla formazione dei contaminanti secondari (O_3 e perossiacetilnitrito) nelle aree interessate da smog;
- c. costituiscono, insieme alla SO_2 , la principale causa dell'acidificazione delle precipitazioni.

Le concentrazioni di NO emesse liberamente dal motore di una automobile costituiscono un reale rischio di tossicità. L'NO può, infatti, direttamente legarsi all'emoglobina portando alla cianosi e addirittura alla morte. Studi a carattere epidemiologico hanno mostrato che le concentrazioni limite di ossidi d'azoto costituenti un rischio per persone in buona salute sono di 0,05 ppm, o superiori, per un'esposizione maggiore di 24 ore [4]. Questo valore è purtroppo spesso superato nelle città a traffico intenso durante le ore di punta o in estate.

A contatto con aria e luce l'NO si ossida facilmente a NO₂ attraverso una reazione fotochimica (Figura 1). Esposizioni acute all'NO₂ possono essere altresì dannose per la salute umana: questo composto agisce principalmente come sostanza ossidante che può danneggiare le membrane e le proteine cellulari. Per esposizioni acute a concentrazioni molto elevate si possono avere risposte infiammatorie delle vie aeree, anche in soggetti sani. Tuttavia, i soggetti asmatici o i pazienti con malattie polmonari croniche ostruttive sono senza dubbio più suscettibili alle basse concentrazioni.

Quadro normativo: Come riportato nel Decreto Ministeriale n.° 60 del 02/04/2002 il valore limite orario per la protezione della salute umana è fissato a 200 µg/m³ di concentrazione media oraria di NO₂, da non superare più di 18 volte per anno con un margine di tolleranza di 100 µg/m³. La soglia di allarme è pari a 400 µg/m³ misurati su tre ore consecutive.

Se nel 1992 la normativa imponeva un massimo di 0,97 g/km, nel 2014 il limite è stato fissato a 0,08 g/km. Il tempo di permanenza medio degli NO_x nell'atmosfera non risulta superare i 3-4 giorni; in aree altamente inquinate essi raggiungono concentrazioni di alcune decine di ppb, anche se si possono riscontrare punte eccezionali dell'ordine di 1 ppm.

2. Licheni come biomarcatori

2.1 Impiego dei licheni nel biomonitoraggio dell'aria

I licheni epifiti sono organismi che colonizzano i tronchi delle piante e che possono essere utilizzati con successo per il monitoraggio della qualità dell'aria dei centri urbani, come attestano i lavori in letteratura scientifica prodotti esponenzialmente negli ultimi venti anni (Figura 2).

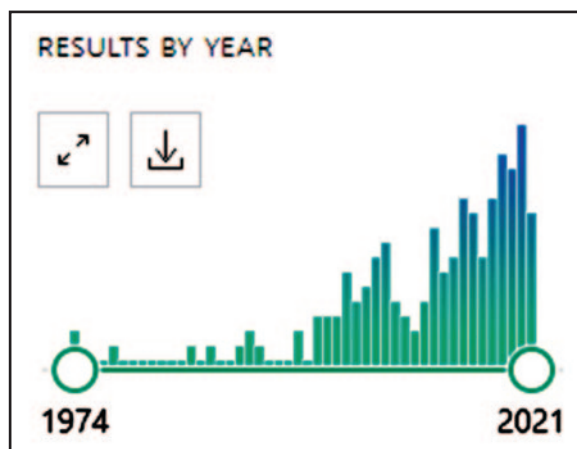


Figura 2. Licheni come bioindicatori: numero progressivo di pubblicazioni apparse su PubMed (search query: "lichens bioindicators")

In presenza di agenti inquinanti quali ossidi di azoto, PM10 e metalli pesanti, i licheni reagiscono con alterazioni morfologiche, ecologiche e fisiologiche modificando il numero delle varie specie presenti (biodiversità) sulla pianta oggetto di indagine (stazione di rilevamento). L'esposizione prolungata agli inquinanti atmosferici determina una diminuzione della variabilità lichenica fino alla loro completa scomparsa. I licheni, infatti, a elevate concentrazioni di inquinamento ambientale, riducono la loro fertilità sessuale e la produzione di clorofilla (altera-

zioni fisiologiche), tendono a smorzare i loro colori e a staccarsi dai tronchi cui aderiscono (alterazioni morfologiche). Alcune specie di licheni sono tipicamente residenti nelle aree urbane e la conta in termini di frequenza della biodiversità può diventare un metodo analitico di facile utilizzo da affiancare alle indagini chimico-fisiche delle centraline automatiche di rilevamento.

2.2 La rete nazionale di biomonitoraggio e il progetto CSMON-LIFE

In Italia vale la pena menzionare due progetti pionieristici nell'uso dei licheni come bioindicatori: il progetto ANPAT [5] e il progetto CSMON-LIFE [6]. Il progetto ANPAT ha l'ambizioso obiettivo di monitorare l'intera penisola italiana e per questo è stata messa a punto una maglia geodetica con interasse di 18 km per collocare circa 301.249 stazioni di campionamento. In figura 3 vengono riportati gli enti che hanno aderito al progetto, applicandolo su scala regionale, e il relativo numero di stazioni di campionamento. Non vengono considerate le regioni nelle quali i monitoraggi sono ancora in corso.

ENTE	N. STAZIONI
ARPA FVG (Friuli Venezia Giulia)	38
ARPAM (Molise)	144
ARPAT (Toscana)	65
APPAT (Trentino)	191
ARPAV (Veneto)	54
ARPA VDA (Valle D'Aosta)	13

Figura 3. Enti e regioni che aderiscono al progetto ANPAT [5]

Accanto al progetto ANPAT che si avvale di una rete nazionale con stazioni fisse di monitoraggio, c'è il progetto CSMON-LIFE (Citizen Science MONitoring), ovvero il primo progetto italiano di "Citizen Science" sulla biodiversità, finanziato in Italia dalla Commissione Europea nell'ambito del programma LIFE+, e che vede la Direzione Ambiente e Sistemi Naturali della Regione Lazio svolgere attività pubbliche di sensibilizzazione per la conservazione del patrimonio naturale. Nell'ambito di questo progetto, grazie all'utilizzo di app scaricabili gratuitamente sullo smartphone, è stata messa a punto una serie di strumenti che vengono utilizzati dal pubblico per la raccolta dei dati scientifici. In questo senso i licheni costituiscono un eccellente "materiale biologico" da monitorare e osservare nei diversi ambienti fruibili dal grande pubblico.

2.3 Metodologia: il metodo IBL

Il biomonitoraggio è una valutazione ambientale condotta con l'utilizzo di bioindicatori, cioè attraverso organismi capaci di avvertire con certezza le alterazioni ecologiche dell'ambiente in cui vivono, alterazioni causate da vari tipi di inquinamento o da fattori di stress ambientale. Il biomonitoraggio non è alternativo alle tecniche analitiche tradizionali, ma è un campo di ricerca che può coadiuvare e ottimizzare la determinazione analitica classica, sia per il monitoraggio dell'inquinamento (individuando possibili zone a rischio), sia per evidenziare possibili correlazioni tra alterazioni di bioindicatori e patologie delle vie aeree superiori [7]. La metodologia utilizzata per l'espressione dell'IBL (Indice di Biodiversità Lichenica) è quella indicata nel manuale ANPA [8], pubblicata nel maggio 2001 con il titolo "IBL – Indice di Biodiversità Lichenica", liberamente scaricabile dal web e utilizzabile a scopi didattici. Il metodo IBL stima lo stato della diversità lichenica in condizioni standard dopo una lunga esposizione a inquinamento atmosferico.

rico o ad altri tipi di stress ambientali. I licheni utilizzati sono essenzialmente epifiti, il che consente di limitare la variabilità di parametri ecologici indipendenti dall'inquinamento, quali tenori in basi o capacità idrica, assai variabili nei substrati litici.

Il presente lavoro è stato eseguito per fornire un'indicazione a grandi linee sullo stato della qualità dell'aria nelle stazioni prese in esame. I rilevamenti sono stati effettuati su alcuni alberi presenti nelle sei stazioni scelte per lo studio del bioaccumulo; il principale scopo dello studio era indagare gli effetti dei contaminanti da traffico veicolare sulla diversità lichenica epifita, prendendo in considerazione come potenziale fonte di contaminazione la S.S. Cassia, che attraversa l'abitato del Comune di Acquapendente.

2.4 Scelta dei siti di monitoraggio

La scelta dei siti di monitoraggio si avvale del supporto dell'archivio storico dell'amministrazione comunale di Acquapendente e dei dati disponibili dell'ARPA, finalizzati a selezionare le aree a maggior tasso di sviluppo industriale e impostare un campionamento razionale. Costituirà inoltre un momento di riflessione sui cambiamenti rurali che hanno interessato nell'ultimo secolo il nostro territorio.

Sono stati quindi individuati sei siti le cui coordinate geografiche sono riportate nella Tabella 1, mentre la loro collocazione sul territorio è segnalata in figura 4.

Più in dettaglio, le sei stazioni di misura sono state collocate nel modo seguente:

- due stazioni in zone non interessate dalla ricaduta di eventuali inquinanti emessi (località "Cupellara", stazioni 1 e 2)
- due stazioni in zone intermedie dove esistono attività artigianali, impianti sportivi e nell'ultimo anno una postazione drive-in tamponi Covid (località "Campo Boario" stazioni 3 e 4)
- due stazioni potenzialmente interessate da ricaduta in quanto soggette ad intenso traffico veicolare (strada statale 2 *Via Cassia*, stazioni 5 e 6)

Per ciascuna stazione si è proceduto a effettuare un rilievo della biodiversità lichenica. I rilevamenti sono stati eseguiti utilizzando un reticolo orientabile costituito da 4 subunità, ciascuna formata da una serie lineare di 5 quadrati di dimensione 10 × 10 cm che devono essere disposte verticalmente sul tronco a un'altezza di un metro dal suolo. Le 4 subunità della griglia devono essere orientate sul tronco dell'albero in corrispondenza dei quattro punti cardinali. Inoltre, gli alberi devono rispondere a determinate caratteristiche affinché i rilievi possano avere i requisiti di validità, che sono:

- a. circonferenza minima di 60 cm, per evitare situazioni con flora lichenica pioniera;
- b. inclinazione del tronco non superiore ai 10°, per evitare effetti dovuti all'eccessiva eutrofizzazione di superfici troppo inclinate;
- c. assenza di evidenti fenomeni di disturbo sulla corteccia (incisioni, verniciature, gravi malattie della pianta ecc.);
- d. copertura di briofite inferiore al 25% della superficie campionabile, per evitare situazioni di forte competizione ecologica per lo stesso habitat.

Stazioni	Coordinate GPS		Quota (m slm)
stazione 1	42° 44' 26" N	11° 51' 34" E	425
stazione 2	42° 44' 27" N	11° 51' 33" E	424
stazione 3	42° 44' 30" N	11° 51' 44" E	395
stazione 4	42° 44' 31" N	11° 51' 43" E	393
stazione 5	42° 44' 39" N	11° 51' 47" E	389
stazione 6	42° 44' 45" N	11° 51' 46" E	378

Tabella 1. Coordinate geografiche delle stazioni di monitoraggio. Il sistema di riferimento geografico utilizzato per la mappa è basato sull'ellissoide WGS84



Figura 4. Stazioni di monitoraggio dell'aria nel Comune di Acquapendente: in alto le stazioni 1 e 2 in località "Cupellara" e le stazioni 3 e 4 in località "Campo Boario"; in basso le due stazioni lungo la strada statale 2 Via Cassia

Sono state annotate, su un'apposita scheda di lavoro, tutte le specie licheniche presenti all'interno di ciascuna unità e la loro frequenza, calcolata come numero di quadrati in cui è presente la specie. Il valore di biodiversità lichenica (IBL), relativo all'albero campionato, si ottiene facendo la somma delle frequenze rilevate per ciascuna subunità. Il valore di biodiversità

lichenica della stazione di campionamento è stimato statisticamente sulla base dei valori rilevati nella stazione stessa.

È prevedibile una sostanziale differenza di crescita sui diversi lati del tronco, le frequenze vanno tenute separate per ciascun punto cardinale: per ciascun albero si ottengono così quattro somme di frequenze (BLjN, BLjE, BLjW, BLjS).

Come previsto dalla normativa ANPA, sono state impiegate classi di naturalità/alterazione delle comunità licheniche per verificare la presenza o meno di pressioni antropiche in grado di interferire con il loro sviluppo. La scala utilizzata per l'interpretazione dei valori dell'IBL è quella proposta da Giordani et al. [9] per le querce caducifoglie della regione mediterranea e submediterranea (Tabella 2). Questa tabella è articolata in sette classi di Biodiversità Lichenica, che esprimono il grado di deviazione da condizioni ritenute "naturali" (zone prive di attività antropiche e lontane da rilevanti fenomeni di dispersione di gas fitotossici). Ad ogni colore corrisponde una precisa classe di qualità dell'aria, il cui valore è dato dalla media dei valori di IBL.

Valore	Classe di naturalità/alterazione	Colore
>186	Naturalità molto alta	Blu
156-186	Naturalità alta	Ciano
125-155	Naturalità media	Verde scuro
94-124	Naturalità bassa/ Alterazione bassa	Verde chiaro
63-93	Alterazione media	Giallo
32-62	Alterazione alta	Arancione
0-31	Alterazione molto alta	Rosso

Tabella 2. Tabella calibrata sulla *fascia tirrenica* [9]

Infine, per quanto riguarda i materiali per il trapianto lichenico, occorrono:

- sacchetti di plastica (quelli per il congelatore)
- guanti in lattice usa e getta
- mascherine usa e getta
- etichette adesive
- spago
- bussola e GPS

2.5 Discussione

Nel corso dei rilievi effettuati in sei stazioni differenti, simili per zona di campionamento a due a due, sono state individuate 16 specie di licheni epifiti, di cui per alcune si è arrivati alla definizione della specie, mentre per altri è stato più difficile completare la classificazione oltre il genere, per la ridotta quantità di materiale costituente i campioni o per mancanza di strumentazione adeguata.

Le stazioni in cui è stata rilevata la maggiore varietà floristica sono quelle site in località “Cupellara”, mentre le stazioni più povere in diversità lichenica sono quelle site lungo la strada statale 2 “Via Cassia”, dove sono state censite solo 8 specie (le tabelle specifiche per le sei stazioni sono riportate in appendice).

Nella Tabella 3 sono riassunti tutti i valori di biodiversità rilevati su ogni singolo forofita. Questi dati sono stati utilizzati per il calcolo dell’Indice di Biodiversità Lichenica della stazione (IBLs), ottenuto mediando i valori di biodiversità rilevati sui diversi forofiti.

Stazione 1-2 Località Cupellara					
<i>Forofita</i>	N	E	S	W	IBL
1	9	12	15	19	
2	22	27	22	23	
3	25	27	16	26	
totale					243
media	18,67	22	17,67	22,67	81
Stazione 3-4 Località Campo Boario					
<i>Forofita</i>	N	E	S	W	IBL
1	24	14	21	12	
2	9	8	11	10	
3	11	8	13	15	
totale					156
media	14,67	10	15	12,34	52
Stazione 5-6 S.S. Cassia					
<i>Forofita</i>	N	E	S	W	IBL
1	5	3	6	9	
2	10	7	8	5	
3	10	10	8	8	
totale					89
media	8,34	6,67	7,34	7,34	29,67

Tabella 3. Valori di biodiversità, tramite IBL totale e IBL medio, rilevata su ogni forofita

Infine, in Tabella 4 sono riassunti i valori totali di IBL riscontrati nelle stazioni prese in esame.

Stazioni	Comune	Distanza dalla S.S. Cassia	Ambiente	IBLm	Alterazione (da Tabella 2)
1 e 2	Acquapendente	0,600 km	Piazzale antistante l'Istituto Omnicomprensivo "Leonardo da Vinci" in località "Cupellara" (alberi di tiglio)	81	Media
3 e 4	Acquapendente	0,390 km	Piazzale del parcheggio in località "Campo Boario" (alberi di tiglio)	52	Alta
5 e 6	Acquapendente	0 km	Margine della strada adiacente alla statale "Via Cassia" (alberi di tiglio)	29,67	Molto alta

Tabella 4. Tabella riassuntiva valori medi di IBL

Concludendo, è possibile riscontrare una correlazione tra i valori medi di IBL (indice biodiversità lichenica) calcolati nelle stazioni prese in esame e la distanza dalla strada statale *Cassia* che attraversa l'abitato di Acquapendente. Più ci si allontana dalla *Via Cassia* (potenziale fonte di contaminazione) e più il valore dell'IBL aumenta.

Utilizzando la scala Giordani (Tabella 2) per l'interpretazione dei valori dell'IBL possiamo farci un'idea della qualità dell'aria nelle tre diverse località sotto studio.

- La fascia di *colore rosso* corrisponde alle zone con i valori di IBL delle stazioni inferiori a 30. Questa fascia coincide in parte con il "deserto lichenico" e, quindi, a una situazione di *alterazione molto alta* della comunità lichenica, a cui si fa corrispondere il peggior livello di qualità dell'aria rilevabile con l'indice di Biodiversità Lichenica (qualità dell'aria pessima). Questo è il dato riscontrato lungo la strada statale Cassia.
- La fascia di *colore arancio* individua zone con un grado di *alterazione alta* delle comunità licheniche a cui corrispondono valori di IBL delle stazioni compresi tra 30 e 60. A queste zone si attribuisce una qualità dell'aria molto scarsa. Questa è la situazione riscontrata per la postazione in località "Campo Boario" che, rispetto a studi condotti negli anni precedenti nell'ambito dello stesso progetto, mostra un deciso peggioramento. Negli ultimi due anni si è infatti passati da un'alterazione media a una alta, situazione probabilmente accentuata dalla presenza in loco di una postazione di Drive-in per Covid-19 e dall'intenso traffico veicolare dovuto al proliferare delle attività dell'adiacente centro sportivo che, per almeno due giorni alla settimana, catalizza l'attenzione della popolazione di Acquapendente e dintorni.
- La fascia di *colore giallo* corrisponde a zone con valori di IBL delle stazioni compresi tra 60 e 90, ossia a situazioni di *alterazione media* delle comunità licheniche. A tali zone si attribuisce una qualità dell'aria scarsa, ma non eccessivamente. Questa è la situazione riscontrata per la postazione in località "Cupellara", dove la qualità dell'aria è in parte compromessa dal traffico veicolare dovuto ai mezzi degli studenti parcheggiati in prossimità delle due stazioni nel parcheggio antistante il nostro Istituto.

I risultati del modello categorizzato sulla base della scala di naturalità/alterazione rispecchiano quanto si poteva prevedere sulla base degli studi degli anni scorsi e delle statistiche descrittive; mostrano, infatti, un quadro non del tutto positivo dello stato di salute delle comunità licheniche epifite e, quindi, dell'aria che respiriamo.

Tale risultato porta a ipotizzare la presenza di considerevoli pressioni antropiche sul territorio nella zona prossima al centro abitato, ovvero lungo la strada statale 2 “Via Cassia” e in zona “Campo Boario”, e una situazione molto meno a rischio a mano a mano che ci si allontana da tali postazioni.

3. Licheni come bioaccumulatori

3.1 Metodologia e innovazione

Tradizionalmente la misurazione delle emissioni atmosferiche viene effettuata tramite analisi chimiche realizzate con centraline fisse o mobili e, in questo campo, l’Istituto “Leonardo da Vinci” di Acquapendente si è già occupato in passato del monitoraggio dell’aria del territorio aquesiano. Le limitazioni di tali tecniche sono legate soprattutto ai seguenti fattori: durata del campionamento e strumentazione più o meno complessa che comporta elevati costi di acquisto ed esercizio. La difficoltà oggettiva di predisporre una rete di controllo con i sistemi chimici convenzionali, per i tempi e i costi che richiederebbe, può essere risolta attraverso l’utilizzo dei licheni come bioaccumulatori, in considerazione della capacità di questi organismi di assorbire e accumulare i contaminanti persistenti, generalmente presenti nell’atmosfera in bassissime concentrazioni. Negli ultimi anni i licheni sono stati ampiamente impiegati come bioaccumulatori di metalli pesanti, di radionuclidi, di non metalli, come lo zolfo e il fluoro, di idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Più recentemente sono comparsi in letteratura lavori che utilizzano i licheni come bioaccumulatori di policlorobifenili (PCBs), diossine (TCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF). In questo progetto ci proponiamo di utilizzare i licheni per la determinazione delle emissioni inquinanti di ossidi di azoto (NO_x), attraverso una metodica analitica messa a punto per la prima volta presso i nostri laboratori.

3.2 Scelta della specie lichenica

La specie selezionata per questo studio è stata ampiamente utilizzata nei lavori di biomonitoraggio ambientale, mostrando correlazioni significative tra le concentrazioni di contaminanti presenti nell’aria (metalli pesanti) e il loro accumulo nei talli trapiantati. Si tratta di *Evernia prunastri* (Figura 5), che è stata scelta per la facilità di reperimento, di crescita, di prelievo e di manipolazione, per la resistenza a malattie e parassiti, per la relativa sensibilità nei confronti degli inquinanti tradizionali (ad es. SO_2) e, infine, per la sua capacità di concentrare rilevanti quantità di alcuni inquinanti senza subire alterazioni morfo-strutturali [10].



Figura 5. *Evernia prunastri*

3.3 Raccolta, preparazione e trapianto dei campioni per l'indagine di bioaccumulo

I talli di *Evernia prunastri* utilizzati per il trapianto sono stati raccolti sulla corteccia di alberi quali roverella (*Quercus pubescens*), cerro (*Quercus cerris*), olmo comune (*Ulmus minor*), acero campestre (*Acer campestre*), a un'altezza di circa un metro dal suolo. Il prelievo è stato effettuato nel bosco adiacente il museo del Fiore, un piccolo museo interattivo e multimediale immerso nei boschi della Riserva naturale di Monte Rufeno a 10 km dal centro abitato di Acquapendente e a 2 km dal borgo medievale di Torre Alfina. Tale area è lontana da rilevanti fonti di inquinamento atmosferico, la vegetazione lichenica è molto abbondante e, per questo, è stata considerata come *stazione di controllo*. Il prelievo è stato eseguito in novembre 2020.

In laboratorio sono state eliminate le parti morte e il materiale estraneo (ad es., foglie, terriccio, talli di altri licheni, ecc.); il tallo di riferimento è stato opportunamente essiccato determinando immediatamente l'azoto totale secondo la metodica messa a punto nei nostri laboratori.

I restanti talli di *Evernia prunastri* sono stati, quindi, inseriti nelle cosiddette "lichen bags", ossia supporti costituiti da un telaio di legno con reti di plastica (Figura 6), per permettere il contatto con l'aria; successivamente questi supporti sono stati fissati a un'altezza di circa due metri dal suolo, su appositi sostegni, nelle stazioni scelte per lo studio. Dopo tre mesi, nel febbraio 2021, è stata ritirata una parte di campione per ogni stazione e su di essa è stata di nuovo eseguita la determinazione dell'azoto totale. Dopo altri tre mesi, a maggio 2021, sono state ritirate le restanti parti di campioni ed eseguite nuovamente le analisi. La scelta di effettuare due campionamenti è dovuta alla necessità di dare più tempo ai licheni di aumentare la quantità di NO_x assorbita, nel caso in cui la metodica non fosse così sensibile da rilevare la quantità dopo soli tre mesi di esposizione. In ogni caso, la replicazione dell'analisi dopo altri tre mesi offre di certo maggiori dati e una maggiore attendibilità statistica.



Figura 6. Lichen bags

3.4 Analisi dei campioni trapiantati: metodi

Il bioaccumulo degli ossidi di azoto (NO_x) è stato stimato attraverso una metodica analitica, messa a punto nei laboratori dell'ITT Chimico di Acquapendente dai docenti di indirizzo (D. Bellocchi e G. Battellocchi), che presuppone la determinazione dell'azoto totale attraverso un'estrazione in controcorrente con il metodo di Kjeldahl e successiva retrotitolazione. Una volta determinato l'azoto nel lichene innestato sulle sei stazioni di controllo, l'azoto accumulato nel periodo di esposizione (presumibilmente sotto forma di NO_x) viene trovato per differenza con l'azoto del campione di controllo. Di seguito riportiamo la metodica che consta delle fasi sotto riportate.

1) *Preparazione campione*: 5 g di *Evernia prunastri* vengono pesati, accuratamente sminuzzati con minipimer e, successivamente, inseriti in un provettone da digestione (Figura 7).



Figura 7. Preparazione del campione

2) *Digestione*: questo processo viene effettuato a 420 °C per 1h, inserendo nel provettone contenente il campione i seguenti reattivi:

- 7 g di K_2SO_4
- 0,6 g di $CuSO_4$ (rapporto 9:1)
- 5 ml H_2O_2 al 35% (130 vol)
- 7 ml H_2SO_4 concentrato
- 2-3 ebollitori

Facendo bollire (Figura 8) il campione di lichene in acido solforico concentrato (miscela di digestione), il risultato è la conversione di tutto l'azoto organico (proteico) in azoto inorganico, cioè $(NH_4)_2SO_4$.

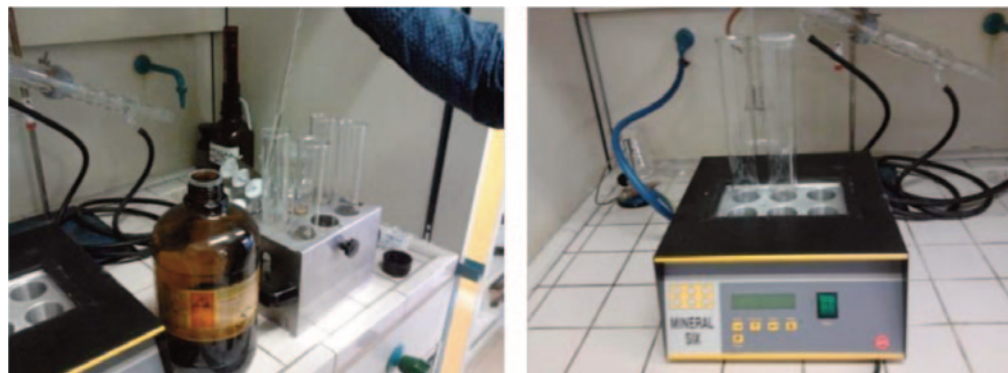


Figura 8. Digestione del campione

3) *Raffreddamento*: i provettoni vengono fatti raffreddare fino alla temperatura di 50 - 60 °C.

4) *Distillazione*: il provettone con il campione digerito viene montato sull'apparato di distillazione; si introducono quindi 50 ml di una soluzione concentrata (30-50% p/v) di NaOH e 50 ml di H_2O . Si effettua la distillazione in corrente di vapore e si raccolgono circa 200 ml di distillato in una beuta contenente già 25 ml di acido bórico (adsorbente); l'aggiunta di una base alla mi-

scelta di digestione acida serve a convertire lo ione ammonio in ammoniaca che viene poi condensata e trattenuta dall'acido borico presente nella beuta (Figura 9).



Figura 9. Distillazione in controcorrente

5) *Titolazione*: si titola il campione nella beuta (200 ml) con HCl 0,1 N e indicatore Tashiro (10 gocce); il *setup* della metodica, effettuato con un campione di lichene prelevato *da bosco* (stazione di controllo museo del Fiore), fornisce un valore di 4,75 mg/200 ml di distillato (5 g di campione), pari a 95 mg di azoto/100 g di lichene, valori in linea con una determinazione di azoto standard su 100 g di prodotto alimentare (Figura 10).



Figura 10. Retrotitolazione

3.5 Risultati

Per prima cosa è stata determinata la quantità di azoto totale del campione di riferimento (bianco), prelevato da un'area ad alta naturalità (museo del Fiore, Torre Alfina). A questo proposito abbiamo ritenuto opportuno effettuare la determinazione del bianco in concomitanza

con le analisi sui campioni per eliminare variabili di accumulo legate alla stagionalità. Vengono, quindi, determinate le quantità di *azoto totale* dopo 6 mesi di esposizione e le quantità di azoto parziali dopo 3 mesi di esposizione, ovvero *trimestre 1* (dicembre 2020 – febbraio 2021) e *trimestre 2* (marzo 2021 – maggio 2021). Si determina infine, per differenza con il bianco, l’azoto accumulato dal tallo che è presumibilmente quello derivante dall’inquinamento veicolare (NO_x).

Per descrivere più chiaramente il livello di accumulo o perdita di NO_x è stato calcolato il rapporto fra la quantità di azoto parziale in ciascun tallo dopo l’esposizione in ogni trimestre e la quantità di esso nel campione di controllo (*EC ratio*) per ogni stazione in studio [11, 12]. I valori derivanti dalle analisi degli *EC ratio* parziali a 3 mesi e 6 mesi di esposizione, sono stati interpretati attraverso la scala a cinque classi riportata in Tabella 5. Tale scala è stata elaborata tenendo in considerazione il fatto che, in assenza di accumulo, il rapporto fra la concentrazione di ogni elemento dopo l’esposizione e quella nel campione di controllo è uguale a 1 (condizione normale). Nel caso in cui *EC ratio* <1 (**perdita**), si ipotizza che non ci sia bioaccumulo di azoto nel tallo, in virtù della necessità del lichene di utilizzare l’azoto per la sua sopravvivenza e riproduzione. Questa situazione in effetti si realizza in zone caratterizzate da condizioni ambientali ottimali, dove i licheni crescono numerosi. Il caso con *EC ratio* >1 (**accumulo**) si ha invece nelle situazioni di bioaccumulo di azoto sotto forma di composti tossici (NO_x) che portano il lichene alla morte. In effetti, avvicinandosi ad aree più inquinate come i centri urbani, i licheni divengono più rari e crescono sempre più lentamente, fino ad arrivare, nelle zone ad alto inquinamento, al cosiddetto “deserto lichenico”.

Scala EC ratio	Livello di accumulo/perdita
0 – 0,25	forte perdita
0,25 – 0,75	perdita
0,75 – 1,25	condizione normale
1,25 – 1,75	accumulo
>1,75	forte accumulo

Tabella 5. Scala utilizzata per l’interpretazione del rapporto fra la concentrazione di ogni elemento dopo l’esposizione e la concentrazione del campione di controllo

Di seguito, e in riferimento alla Tabella 5, vengono riportati in Tabella 6 i risultati sul biomonitoraggio condotto da dicembre 2020 a maggio 2021 degli ossidi di azoto (NO_x): NO , NO_2 , N_2O , N_2O_3 , N_2O_5 .

	Bianco	Stazioni					
		1 Pergola	2 Torre	3 Campo Boario (drive-in)	4 Campo Boario	5 Cupellara	6* Cupellara
Azoto totale Trimestri 1 + 2		32,94	35,74	21,44	11,08	13,88	29,99
Azoto parziale Trimestre 1	4,75	16,5	10,1	4,31	3,93	2,9	4,36
NO_x accumulato Trimestre 1	/	11,75	5,35	-0,44	-0,82	-1,85	-0,39
EC ratio Trimestre 1		3,47	2,12	0,90	0,82	0,61	0,91
Azoto parziale Trimestre 2	7,30	16,44	25,64	17,13	7,15	10,98	25,63
NO_x accumulato Trimestre 2	/	11,69	20,89	12,38	2,4	6,23	20,88
EC ratio Trimestre 2		2,25	3,51	2,34	0,97	1,50	3,51

Tabella 6. Concentrazioni (mg/5g) di azoto totale e parziale in talli di licheni *Evernia prunastri* nei sei siti esaminati; vengono riportati anche i relativi EC ratio (Trimestre 1: dicembre 2020 – febbraio 2021; Trimestre 2: marzo 2021 – maggio 2021; *campione ritrovato a terra)

3.6 Discussione

Per descrivere più chiaramente il livello di accumulo di ogni inquinante viene riportato, in figura 11, l'EC ratio per ogni stazione di controllo dopo il trimestre 1e il trimestre 2 di esposizione. I

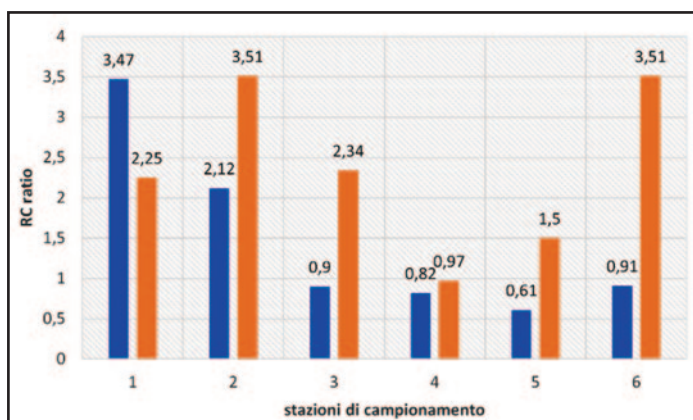


Figura 11. Valori di EC ratio riscontrati nelle sei stazioni dopo il primo trimestre (dati in azzurro) e dopo il secondo semestre (dati in arancione)

risultati evidenziano un accumulo di azoto proporzionale al tasso di viabilità delle zone oggetto di studio, confermando, da un lato, l'ideoneità di tale specie lichenica a essere utilizzata come bioaccumulatore, e, dall'altro, la presenza di NO_x in aree a tasso di viabilità elevato e la loro assenza in aree non esposte a emissioni inquinanti.

Lo studio mette altresì in evidenza due importanti anomalie di seguito riportate.

Campo Boario: valutando le differenze nei profili EC ratio delle stazioni 3 e 4 a sei mesi di esposizione (Figura 11), si può constatare come solo la stazione 3 risulti interessata da un considerevole aumento delle concentrazioni di NO_x . Tale anomalia può essere spiegata con il fatto che, a partire dal dicembre 2020, in prossimità della stazione 3 è stato istituito un "Drive-in test point" per i tamponi nasofaringei standard e antigenici SARS-CoV2 (Figura 12) [13]. Si può, quindi, ipotizzare che il considerevole aumento di NO_x nella sola stazione 3 sia da imputare all'aumento del traffico veicolare in piena emergenza CoVID (auto in fila con motore acceso). Nella stazione 4, distante dal Drive-in, permangono invece condizioni di bioaccumulo costanti e normali.



Figura 12. Ingresso al Drive-in test point di Acquapendente; in fondo si scorge il gazebo per accettazione, proprio davanti l'albero dove era posizionata la "lichen bag" (stazione di controllo 3)

Cupellara: questa zona, stazione 6, rappresenta quella meno interessata dal traffico veicolare e, come ci si aspettava, in generale permangono condizioni di accumulo normali di NO_x almeno fino al primo trimestre (Figura 11). Nel secondo trimestre, invece, si evidenzia un accumulo di NO_x attribuibile, si ipotizza, all'arrivo della bella stagione e all'evidente aumento del traffico motorizzato nel piazzale della scuola. L'aumento consistente che si osserva in questa stazione durante il secondo trimestre è ragionevolmente dovuto all'inquinamento del campione in seguito al suo distacco dall'albero: il campione è stato infatti ritrovato a terra.

4. Conclusioni

In questo lavoro viene monitorata per la prima volta la qualità dell'aria del comune di Acquapendente attraverso il metodo IBL. Contestualmente vengono determinate anche le emissioni di NO_x attraverso una metodica analitica messa a punto nei nostri laboratori. I risultati mettono in evidenza come la qualità dell'aria della zona "Campo Boario" si sia nel tempo rapidamente deteriorata. Questa zona negli anni è stata oggetto di una profonda trasformazione urbanistica che

l'ha portata a divenire uno dei principali poli sportivi dell'Alta Tuscia, con la presenza di un palazzetto dello sport, impianti di tennis e campi di calcio. In questa zona si riversano settimanalmente dai paesi limitrofi intere famiglie per frequentare le numerose attività organizzate dalla polisportiva che gestisce gli impianti. In questo contesto, la messa in essere di un drive-in COVID ha di fatto esacerbato una condizione di inquinamento già di per sé critica. I risultati di questa analisi dell'aria verranno divulgati sul portale del nostro Istituto dedicato al monitoraggio ambientale del territorio aquesiano "Scuola.Lab" [1]. La metodica analitica di determinazione del bioaccumulo di NO_x verrà utilizzata dai nostri studenti per indagini future sulla qualità dell'aria del territorio di Acquapendente.

Da un punto di vista civico, il presente lavoro ci ha permesso di realizzare i seguenti obiettivi:

- Conoscere le specie autoctone e ruolo ecologico degli ecosistemi di riferimento.
- Conoscere e applicare metodiche proprie dell'analisi chimica e dei censimenti biologici, anche con l'uso di strumenti specifici e il potenziamento dei laboratori scientifici.
- Favorire e promuovere la *Citizen Science*, (scienza dei cittadini) ovvero un approccio civico e di comunità alla scienza a cui partecipano semplici cittadini.
- Sviluppare una piattaforma (database) di raccolta dati e implementare il sito web di presentazione dati istituzionale.
- Conoscere ed essere consapevoli dell'importanza della biodiversità e della sua conservazione.
- Promuovere la partecipazione consapevole, responsabile e autonoma degli studenti in attività di controllo e salvaguardia dell'ambiente, con l'individuazione dei comportamenti collettivi e personali da tenere per la sua conservazione.
- Promuovere la cultura tecnico-scientifica sul territorio attraverso la diffusione delle attività svolte e dei risultati ottenuti.

Riferimenti

- [1] "Scuola.Lab" ITT Chimico "Leonardo da Vinci" (<https://www.scuolalab.com/>)
- [2] M. Livi, *Sviluppi di catalizzatori per l'abbattimento di NO_x in presenza di ossigeno*, Tesi di dottorato in chimica industriale (XX Ciclo).
- [3] H. S. Stoker, S. L. Seager, *Inquinamento dell'aria e dell'acqua*, ISEDI, 1974.
- [4] M. Chiron, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 1997, **30**, 1.
- [5] <https://www.architetturaecosostenibile.it/green-life/curiosita-ecosostenibili/bioindicatori-valutare-qualita-aria-licheni-804>
- [6] CSMON-Life <http://www.csmon-life.eu/>
- [7] P. L. Nimis, C. Cislighi, *Nature*, 1997, **387**, 463.
- [8] Manuale IBL (Indice di Biodiversità Lichenica) on line, ANPA, 2009 (http://sira.arpat.toscana.it/sira/documenti/manuale_ibl.pdf)
- [9] P. Giordani, *Journal of Vegetation Science*, 2006, **17**, 195.
- [10] P. Giordani, et al., *Linee guida per l'uso dei licheni come bioaccumulatori*, ISPRA, Manuali e Linee Guida 189, 2019.
- [11] L. Frati, G. Brunialti, S. Loppi, *Journal of Atmospheric Chemistry*, 2005, **52**, 221.
- [12] M. Guidotti, et al., *Studio della qualità dell'aria mediante licheni nella zona del termovalorizzatore di San Vittore*, ARPA Lazio, Sezione provinciale di Rieti, Divisione atmosfera e impianti 2014.

[13] <http://www.amiatanews.it/acquapendente-coronavirus-attivo-dal-primo-dicembre-il-drive-in-test-point-il-comune-importante-per-tutta-lalta-tuscia/>

APPENDICE

Tabelle della frequenza di specie di lichene per albero nelle sei stazioni monitorate

Stazione	n. 1 e 2 - località "Cupellara"											
Data	21 marzo											
Specie arborea	<i>Prunus Cerasifera</i>				Tiglio				Tiglio			
Circonferenza (cm)	100				90				105			
Specie di lichene	1° albero				2° albero				3° albero			
	N	E	S	W	N	E	S	W	N	E	S	W
<i>Physcia tenella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leprocaulon quisquillare</i>	0	0	0	0	1	2	3	1	1	1	0	2
<i>Phlyctis argena</i>	0	0	0	0	5	4	5	4	5	5	5	3
lichene nero (specie non identificata)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Physconia servitii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthoria parietina</i>	5	5	5	5	2	3	2	3	5	5	4	5
<i>Punctelia borreri</i>	0	1	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
<i>Flavoparmelia spp</i>	1	0	2	1	2	3	1	1	0	3	1	2
<i>Evernia prunastri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hypogimnia tubulosa</i>	0	0	1	2	1	4	0	2	0	0	0	0
<i>Parmelina spp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amandinea punctata</i>	0	1	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Candelariella spp</i>	0	2	1	0	0	0	1	0	4	3	1	3
<i>Lecanora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Collema spp</i>	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
specie non identificata	3	2	0	5	5	5	5	5	5	5	0	5

Biomonitoraggio e determinazione delle emissioni inquinanti di NO_x tramite licheni

Stazione	n. 3 e 4 – località "Campo Boario"											
Data	21 marzo											
Specie arborea	<i>Acero campestre</i>				<i>Quercia</i>				<i>Quercia</i>			
Circonferenza (cm)	80				105				75			
Specie di lichene	1° albero				2° albero				3° albero			
	N	E	S	W	N	E	S	W	N	E	S	W
<i>Physcia tenella</i>	4	4	4	4	4	2	3	4	4	4	4	3
<i>Leprocaulon quisquillare</i>	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phlyctis argena</i>	4	0	0	0	0	1	3	0	0	1	0	2
<i>lichene nero (specie non identificata)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Physconia servitii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthoria parietina</i>	3	1	3	2	2	2	2	1	3	2	2	3
<i>Punctelia borrieri</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Flavoparmelia spp</i>	4	1	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Evernia prunastri</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Hypogimnia tubulosa</i>	2	0	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Parmelina spp</i>	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Amandinea punctata</i>	3	4	3	0	0	0	1	0	0	0	2	3
<i>Candelariella spp</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lecanora</i>	0	0	0	0	2	1	0	5	4	0	2	1
<i>Collema spp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2

Stazione	n. 5 e 6 - località "Via Cassia"											
Data	21 marzo											
Specie arborea	<i>Tiglio</i>				<i>Tiglio</i>				<i>Tiglio</i>			
Circonferenza (cm)	180				165				193			
Specie di lichene	1° albero				2° albero				3° albero			
	N	E	S	W	N	E	S	W	N	E	S	W
<i>Physcia tenella</i>	2	0	5	5	2	5	4	2	5	3	5	5
<i>Leprocaulon quisquillare</i>	3	1	0	3	5	0	0	1	5	4	0	3
<i>Phlyctis argena</i>	0	2	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>lichene nero (specie non identificata)</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	3	0
<i>Physconia servitii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthoria parietina</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Punctelia borrieri</i>	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0
<i>Flavoparmelia spp</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0