

# La bioindicazione mediante licheni: potenzialità, limiti e sviluppi

Stefano Loppi<sup>1\*</sup>, Silvana Munzi<sup>1,2</sup>, Luca Paoli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena, Italia

<sup>2</sup> Centro di Biologia Ambientale, Università di Lisbona, Portogallo

<sup>3</sup> Istituto di Botanica, Accademia Slovaca delle Scienze, Slovacchia

\* Referente per la corrispondenza: stefano.loppi@unisi.it

Pervenuto il 11.4.2012, accettato il 11.10.2012

## Riassunto

In occasione del Seminario celebrativo del 25° anniversario del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale (CISBA), “*La bioindicazione come strumento di conoscenza e di gestione degli ecosistemi*” è stata presentata una rassegna di risultati acquisiti in studi di bioindicazione mediante licheni, per sottolineare l’importanza delle informazioni fornite da queste metodologie (complementari ai dati dei sistemi automatici di monitoraggio) ed evidenziarne le potenzialità, le criticità e le necessità di sviluppo. Prendendo spunto da ricerche di laboratorio e studi in campo condotti attorno a sorgenti puntiformi di inquinamento e lungo gradienti ambientali, sono discussi alcuni aspetti di attualità nel monitoraggio lichenico, con riferimento agli effetti biologici dell’inquinamento atmosferico, dell’eutrofizzazione degli habitat e dei cambiamenti climatici.

PAROLE CHIAVE: Inquinamento atmosferico / biomonitoraggio / cambiamento climatico / licheni / azoto

## Bioindication with lichens: potential, limits and perspectives

During a workshop celebrating the 25<sup>th</sup> anniversary of the “Italian Centre of Studies on Environmental Biology” (CISBA) entitled “*Bioindication as a tool for knowledge and management of ecosystems*” the results of laboratory and field studies carried out using lichens as bioindicators were briefly summarized. Monitoring around air pollution sources and along environmental gradients offered the opportunity to discuss potentialities, limits, critical aspects and needs for future development of bioindication techniques in lichenology. Topics included the biological effects of atmospheric pollution, habitat eutrophication and climate change.

KEY WORDS: Air pollution / biomonitoring / climate change / lichens / nitrogen pollution

## INTRODUZIONE

“*Les lichens donnet à leur manière la mesure de la salubrité de l’air*” (NYLANDER, 1866)

La sensibilità dei licheni all’inquinamento atmosferico è un dato di fatto. Le prime osservazioni sulla relazione tra licheni e inquinamento atmosferico risalgono alla metà del 1800, ai lavori di LEO GRINDON

(1859) sulla scomparsa dei licheni dall’area urbana di Manchester e di WILLIAM NYLANDER (1866) sulla scomparsa dei licheni dal “Jardin du Luxembourg” a Parigi e già allora si affermava chiaramente che i licheni danno una misura della qualità dell’aria. È prassi comune far risalire a queste osservazioni pionieristiche l’origine

della bioindicazione mediante licheni. Oggi è ben assodato che i licheni sono affidabili indicatori degli effetti biologici dell'inquinamento atmosferico. Nel loro ruolo di indicatori biologici sono un utile strumento di indagine per quanto riguarda gli effetti dell'inquinamento, dell'eutrofizzazione e dei cambiamenti climatici.

I licheni sono funghi (micobionti) che vivono in simbiosi con alghe verdi o cianobatteri (fotobionti) e, diversamente dalle piante superiori, non possiedono né radici, né una cuticola cerosa che li protegge e dipendono esclusivamente dall'atmosfera per l'apporto di nutrienti minerali. Queste caratteristiche, insieme al fatto che sono in grado di crescere un po' ovunque e alla capacità di accumulare elementi in traccia ben oltre i loro fabbisogni metabolici, li rendono degli ottimi bioindicatori dell'inquinamento atmosferico.

I licheni possono fornire "risposte precoci" agli stress ambientali e misurarne gli effetti anche a lungo termine. Le risposte precoci sono identificabili a livello fisiologico (indicatori di vitalità), mentre gli effetti a lungo termine si rilevano attraverso variazioni nella composizione e struttura delle comunità licheniche, evidenti sia con la scomparsa delle specie più sensibili, sia con la diffusione di specie più tolleranti agli stress.

L'informazione fornita dai licheni è indicativa di una risposta biologica all'effetto sinergico di tutti gli inquinanti presenti nell'aria e consente di integrare le routinarie misure strumentali chimico-fisiche. I licheni consentono di individuare segnali di allarme in quanto identificano indirettamente aree in cui il livello di inquinamento ha effetto su un organismo sensibile e aree che possono perciò essere oggetto di un più accurato monitoraggio chimico-fisico.

Per la loro affidabilità e i costi contenuti, i metodi basati sui bioindicatori vegetali (muschi, licheni, piante superiori) possono trovare importanti applicazioni nei paesi in via di sviluppo (BARGAGLI, 2006). Attualmente, in Europa e nel Nord America, dove si sono verificate sostanziali riduzioni delle concentrazioni di molti inquinanti fitotossici, è opportuno lo sviluppo di nuovi marker per utilizzare questi biosensori, in modo da fornire specifiche risposte a condizioni di esposizione a più basse concentrazioni degli inquinanti (BARGAGLI, 2006).

Negli ultimi anni, con la riduzione delle emissioni di SO<sub>2</sub>, che in passato hanno rappresentato uno dei principali inquinanti e che hanno provocato la scomparsa dei licheni da vaste aree urbane e industrializzate, i composti azotati emessi in atmosfera in conseguenza di attività antropiche sono diventati uno dei principali fattori in grado di influenzare gli ecosistemi (GALLOWAY, 1998). A causa delle attività umane, in particolare l'uso di combustibili fossili e le forme industriali di agricoltura, l'inquinamento da azoto ha

raggiunto livelli preoccupanti a scala mondiale. Il tema è di grande attualità: i processi umani convertono in forme reattive più azoto atmosferico della totalità dei processi naturali, perturbando il ciclo di questo elemento con conseguenze per l'ambiente e la salute umana ancora non del tutto conosciute (GRUBER e GALLOWAY, 2008). La scarsa efficienza nell'uso dell'azoto fa sì che una larga parte di queste forme reattive sia dispersa nell'ambiente, accumulandosi negli ecosistemi acquatici e terrestri e provocandone l'eutrofizzazione e l'acidificazione. La resilienza di importanti sottosistemi del pianeta viene così erosa, compromettendo, a volte irreversibilmente, molti sistemi e processi (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009).

I licheni sono tra gli organismi più sensibili all'inquinamento da azoto (in particolare NH<sub>3</sub>) a livello di ecosistema. Come per altri inquinanti, l'approccio tradizionale consiste nell'identificare la composizione in specie delle comunità licheniche epifite presenti in una data area e nel valutare i cambiamenti che in queste comunità avvengono negli anni. Esistono molti studi di questo tipo, specialmente nell'Europa settentrionale, ad esempio nei Paesi Bassi, dove le emissioni di azoto sono un problema particolarmente rilevante (VAN HERK, 1999). Gli svantaggi di tale approccio sono i tempi lunghi che i cambiamenti a livello di comunità richiedono e il fatto che solitamente il risultato integra la risposta delle varie specie senza considerare le caratteristiche delle singole specie indicatrici. L'uso dei "gruppi funzionali" consente di risolvere l'ultimo punto, perché, tenendo conto delle richieste ecologiche delle singole specie licheniche, permette di definire dei gruppi caratterizzati da una risposta comune a un determinato fattore ambientale. In questo modo, le informazioni fornite sono più precise e maggiormente corrispondenti alle reali condizioni ambientali. Studi di questo tipo sono stati utilizzati per la definizione dei livelli massimi di deposizioni di azoto (*critical loads*, *critical levels*) in alcune foreste degli Stati Uniti (GEISER *et al.*, 2010) e in foreste semi-naturali in ambiente mediterraneo (PINHO *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni si è sviluppata e acquista sempre maggiore importanza l'ecofisiologia, che studia i meccanismi fisiologici alla base delle osservazioni ecologiche. Applicando tale approccio nel biomonitoraggio si possono ottenere risposte rapide che permettono di rilevare le modificazioni ambientali mentre stanno avvenendo e non quando sono già avvenute e di intervenire quindi tempestivamente. Nel caso dei licheni, sono in studio diversi test basati sulla misura di variabili fisiologiche sensibili ai composti azotati e ai metalli pesanti. Allo scopo di illustrare le opportunità offerte dai licheni e le problematiche di ricerca relative alla loro applicazione, vengono riportati i risultati di alcuni studi

condotti presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università di Siena, unitamente ad alcune applicazioni in campo relative all'inquinamento da composti azotati, al monitoraggio biologico degli effetti dell'inquinamento atmosferico intorno a sorgenti puntiformi e diffuse e anche allo studio delle risposte ai cambiamenti climatici.

### **RISPOSTE FISILOGICHE DEI LICHENI COME INDICATORI PRECOCI DI STRESS**

Negli ultimi decenni, diversi parametri biochimici e fisiologici sono stati introdotti in lichenologia e possono essere utilizzati per valutare la vitalità dei licheni e il grado di stress ambientale (BAČKOR, 2011). Lo sviluppo delle tecniche biochimiche, fisiologiche e molecolari è pertanto di rilevanza cruciale per il progresso della lichenologia sperimentale e per la comprensione dei meccanismi di tossicità e tolleranza agli stress ambientali.

Fra i vari indicatori fisiologici della vitalità dei talli lichenici, è stato dimostrato che l'inquinamento atmosferico riduce l'integrità delle membrane cellulari (BRANQUINHO *et al.*, 1997), aumenta la perossidazione dei lipidi di membrana (PISANI *et al.*, 2009), fa diminuire l'efficienza fotosintetica (GARTY *et al.*, 2001), altera l'integrità della clorofilla (GARTY *et al.*, 1993) e le concentrazioni stesse dei pigmenti fotosintetici nei licheni (BAČKOR e ZETÍKOVÁ, 2003). Queste risposte fisiologiche mostrano variazioni in seguito all'esposizione dei campioni da siti non contaminati a siti inquinati, poiché sono indicatrici di una condizione di stress che occorre al tallo lichenico nel suo complesso (GONZÁLES e PIGNATA, 1994) e possono funzionare da indicatori precoci di condizioni ambientali alterate (PAOLI *et al.*, 2008).

Il primo sito di interazione di un inquinante con il tallo lichenico è la parete cellulare e con essa la membrana cellulare. In genere, i danni ai tessuti o alle cellule portano all'alterazione della permeabilità delle membrane cellulari e di conseguenza alla perdita di elettroliti. Un test semplice per valutare l'integrità delle membrane cellulari consiste nell'immergere un frammento di tallo lichenico in acqua deionizzata e nel misurare poi la conducibilità elettrica dell'acqua di immersione (SIMON, 1974). Le soluzioni che si ottengono con licheni esposti a condizioni di stress, tra cui composti inquinanti, hanno valori di conducibilità elettrica più alti rispetto ai controlli (PEARSON e HENRICKSSON, 1981). Questo incremento rappresenta un buon indicatore specifico di stress ed è determinato dalla fuoriuscita nell'acqua degli ioni contenuti all'interno delle cellule, soprattutto  $K^+$ . La perdita di elettroliti è proporzionale alla durata dell'esposizione, alla concentrazione dei composti chimici e al danno alle membrane. È stato

inoltre osservato che i processi di ossidazione a carico delle membrane cellulari sono provocati dalle specie chimiche reattive all'ossigeno (ROS) e che la presenza di prodotti di ossidazione (es., malondialdeide -MDA; idroperossidieni HPCD) è connessa con la perossidazione degli acidi grassi insaturi. Pertanto, in seguito a stress ossidativi provocati dai contaminanti ambientali, si può osservare un aumento di MDA e HPCD (GONZÁLES e PIGNATA, 1997). Un altro modo semplice per valutare la vitalità dei licheni consiste nel misurare la capacità di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) a trifetilformazano (TPF) (BAČKOR e FAHSELT, 2005), che può essere influenzata da stress ossidativi o dall'esposizione a metalli o ad altri elementi tossici.

Fra i possibili effetti, è stato recentemente osservato come l'esposizione a metalli provochi un aumento di prodotti di perossidazione, una riduzione dell'emissione di fluorescenza da parte del partner algale, la degradazione della clorofilla a feofitina, la diminuzione del contenuto in pigmenti fotosintetici, una diminuzione di vitalità indicata dalla riduzione del trifeniltetrazolio cloruro (TTC) a formazano e la riduzione del contenuto di proteine idrosolubili (BAČKOR *et al.*, 2010; BAČKOR, 2011; PISANI *et al.*, 2009; 2011a; 2011b).

L'analisi dell'emissione di fluorescenza è utilizzata per valutare l'efficienza dei processi fotosintetici che avvengono nel fotosistema II (PSII) dell'alga lichenica. Il parametro preso in considerazione negli esperimenti intrapresi è solitamente il rapporto  $F_v/F_m$ , dove  $F_m$  indica il valore di fluorescenza massima ottenuta dopo l'applicazione di un flash di luce saturante a un campione adattato al buio e  $F_v$  la differenza tra  $F_m$  e  $F_0$ , il livello minimo di fluorescenza che è emessa dal campione adattato al buio. Il rapporto  $F_v/F_m$  è un classico indicatore della performance fotosintetica dell'intero organismo (MAXWELL e JOHNSON, 2000). Il secondo parametro adottato è l'Indice di Performance fotosintetica (PIabs), derivato da STRASSER e colleghi (2000), in funzione dell'energia assorbita dal fotosistema II e derivato a partire da altri indici relativi al sequestro di energia e all'efficienza di trasporto degli elettroni. Questo parametro appare più sensibile ed è generalmente utilizzato per rapidi screening di campioni vegetali, con lo scopo di fornire adeguate indicazioni riguardanti struttura, conformazione e funzionamento dei loro apparati fotosintetici (STRASSER *et al.*, 2000).

Pertanto, i parametri ecofisiologici sopra descritti possono essere utilizzati come indicatori specifici di risposta a uno stress, sia in condizioni controllate di laboratorio, che in esperimenti di campo volti a individuare precocemente segnali di stress. Lo sviluppo di test ecotossicologici affidabili basati su questi parametri è un aspetto rilevante per il progresso della lichenologia sperimentale.

## BIODIVERSITÀ LICHENICA COME INDICATORE DI STRESS A LUNGO TERMINE

Come noto, le tecniche di bioindicazione consentono di valutare l'impatto ambientale di alcuni fattori di stress su componenti sensibili degli ecosistemi (indicatori biologici) e di utilizzare la risposta di tali componenti come stima delle condizioni ambientali, contribuendo a integrare informazioni puntuali di natura chimico-fisica ottenute per via strumentale (NIMIS *et al.*, 2002). Il biomonitoraggio si concretizza nella produzione di dati biologici, quali misure di biodiversità, risposte fisiologiche o genetiche e misure di concentrazioni degli elementi negli organismi. Tali misure hanno un valore intrinseco, indipendente dall'eventuale correlazione con dati strumentali di inquinamento, poiché con esse si identificano e misurano deviazioni da condizioni normali di componenti degli ecosistemi reattivi all'inquinamento e agli stress ambientali.

I primi studi organici sulla biodiversità lichenica come indicatore ambientale hanno visto l'utilizzo di scale di sensibilità e di indici di qualità dell'aria (FERRY *et al.*, 1973); tali indici (es., IAP – Index of Atmospheric Purity) sono stati in seguito standardizzati per quantificare la biodiversità dei licheni epifiti e utilizzarla per esprimere un giudizio sulla qualità ambientale (KRICKE e LOPPI, 2002; ASTA *et al.*, 2002). L'Indice di Biodiversità Lichenica (IBL) attualmente in uso, è determinato secondo procedure standardizzate a livello nazionale (ANPA, 2001) ed internazionale (LDV - ASTA *et al.*, 2002). Il giudizio sulla qualità ambientale si può esprimere in termini di deviazione rispetto alle condizioni definite normali/naturali per l'IBL di una determinata area secondo la metodologia proposta da LOPPI *et al.* (2002).

Un'analisi approfondita mostra inoltre come l'interpretazione dei dati sia ancora un aspetto critico, evidenziando la complessità della risposta dei licheni. Infatti, diversi tipi di inquinanti possono generare effetti contrastanti sulle comunità licheniche: è noto che la diversità lichenica è più influenzata dagli inquinanti gassosi quali  $\text{SO}_2$  (SEAWARD, 1993) e  $\text{NO}_x$  (DAVIES *et al.*, 2007) originati dai processi di combustione che non dai metalli pesanti e dal particolato atmosferico. Con la generale riduzione dei livelli di  $\text{SO}_2$  avvenuta negli ultimi decenni in molte aree urbane e il contemporaneo aumento dei livelli di  $\text{NO}_x$ , questi ultimi sono attualmente diventati gli inquinanti principali in prossimità di strade intensamente trafficate, aree urbane e industrializzate (WOLSELEY *et al.*, 2004). Come conseguenza, si è avuta una rapida ricolonizzazione degli ambienti urbani da parte dei licheni, con un'abbondante diffusione delle specie

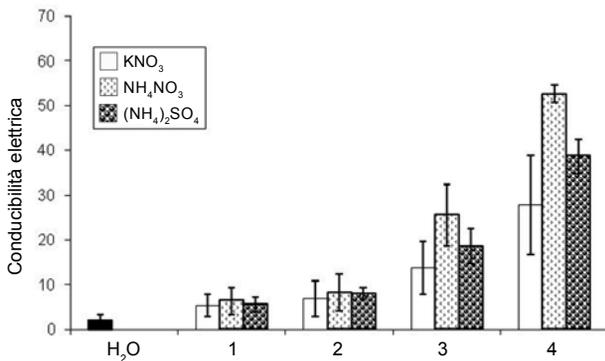
nitrofile (GOMBERT *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2007). I composti a base di zolfo sono ben noti per influenzare negativamente lo sviluppo delle comunità licheniche, determinando una riduzione nel numero e nella frequenza delle specie, ma per quanto concerne gli ossidi di azoto ( $\text{NO}_x$ ) e l'ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ), gli effetti sui licheni non sono completamente chiariti (DAVIES *et al.*, 1997). Segnali legati all'eccesso di azoto nell'ambiente si possono dedurre dalla composizione delle comunità di piante superiori, con un incremento di specie nitrofile e una diminuzione delle altre (STULEN *et al.*, 1998). In molte aree urbane, gli  $\text{NO}_x$  sono spesso il maggiore inquinante in prossimità di strade a traffico elevato, mentre attività agricole intensive in aree rurali hanno come conseguenza un aumento delle deposizioni di ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ), ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ed azoto organico (WOLSELEY *et al.*, 2004).

In aree con clima caldo e secco, come nel bacino del Mediterraneo, lo studio degli effetti dei composti azotati sulle comunità licheniche può risultare complicato dalla concomitante azione delle polveri (LOPPI e DE DOMINICIS, 1996; FRATI *et al.*, 2008). Infatti, deposizione di polveri, luce e aridità possono concorrere ad aumentare il pH delle scorze dei substrati arborei e favorire così le specie nitrofile anche su scorze normalmente più acide.

Anche i processi di eutrofizzazione legati alla presenza di attività agricole sono in grado di modificare le comunità licheniche, come hanno mostrato vari studi condotti in diversi paesi Europei. Alcuni studi (LOPPI e DE DOMINICIS, 1996; LOPPI e PIRINTSOS, 2000) hanno mostrato che l'alta frequenza di specie nitrofile in aree agricole dell'Italia Centrale e della Grecia è determinata dal contributo di fattori quali il microclima arido e il sollevamento e la deposizione di polveri basiche sui tronchi degli alberi. Studi condotti nel Regno Unito, in Svizzera e nell'Italia Centrale hanno evidenziato che la massiccia presenza di specie nitrofile in alcune aree è legata alla contemporanea presenza di deposizioni azotate connesse con l'allevamento del bestiame (RUOSS, 1999; RUISI *et al.*, 2005). Inoltre, studi condotti in Grecia hanno evidenziato come il pascolo intensivo favorisca l'eutrofizzazione e la diffusione di comunità licheniche nitrofile (PIRINTSOS *et al.*, 1998). L'applicazione di fertilizzanti determina un arricchimento in nutrienti degli habitat e modifica la composizione della flora lichenica, arricchendola in specie nitrofile e riducendo la componente acidofila. Nei Paesi Bassi, alti livelli di composti azotati in atmosfera hanno determinato la diffusione di comunità licheniche dominate da specie nitrofile, favorite anche dalla contemporanea riduzione degli ossidi di zolfo (VAN HERK, 1999).

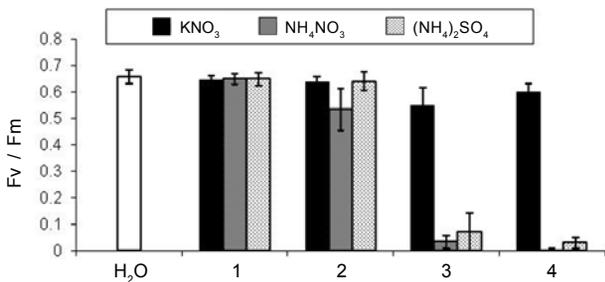
### INQUINAMENTO DA COMPOSTI AZOTATI

I nostri primi studi condotti presso il Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università di Siena sull'inquinamento da sostanze azotate erano rivolti a individuare dei parametri sensibili che potessero essere utilizzati come indicatori precoci di stress da azoto. Trattando la specie sensibile *Evernia prunastri* con concentrazioni elevate di vari composti di azoto per esasperarne la risposta fisiologica, è stato osservato che il danneggiamento delle membrane cellulari nel fungo (Fig. 1, MUNZI *et al.*,



**Fig. 1.** Danneggiamento della membrana cellulare espresso come conducibilità elettrica dell'acqua di immersione (µS/cm)/(mg/mL) in *Evernia prunastri* esposta a concentrazioni crescenti di composti azotati (in tutti i grafici le barre verticali indicano la deviazione standard, DS).

1 = KNO<sub>3</sub> 0,05 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 M; 2 = KNO<sub>3</sub> 0,1 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,1 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M; 3 = KNO<sub>3</sub> 0,5 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,5 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M; 4 = KNO<sub>3</sub> 1 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M; (da MUNZI *et al.*, 2009, modificato).



**Fig. 2.** Fluorescenza della clorofilla *a* espressa come rapporto  $F_v/F_M$  ( $\pm$  DS) in *Evernia prunastri* esposta a concentrazioni crescenti di composti azotati.

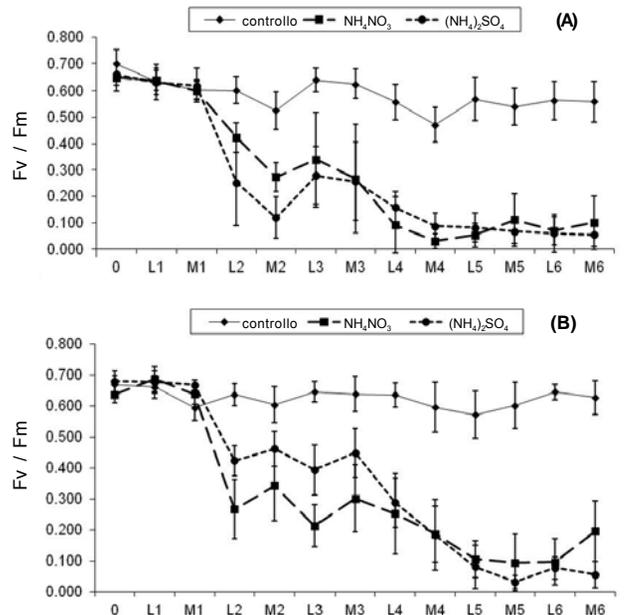
$F_M$  = valore di fluorescenza massima;  $F_v$  = fluorescenza variabile, determinata dalla differenza fra la fluorescenza massima  $F_M$  e la fluorescenza basale  $F_0$

1 = KNO<sub>3</sub> 0,05 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 M; 2 = KNO<sub>3</sub> 0,1 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,1 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M; 3 = KNO<sub>3</sub> 0,5 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,5 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M; 4 = KNO<sub>3</sub> 1 M, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 M e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M; (da PIRINTSOS *et al.*, 2009, modificato).

2009) e la fluorescenza della clorofilla *a* nell'alga (Fig. 2, PIRINTSOS *et al.*, 2009) rispondono a trattamenti con alte concentrazioni di ammonio.

Al contrario, gli stessi trattamenti in *Xanthoria parietina*, una specie resistente e talvolta favorita da alte concentrazioni di azoto, non hanno provocato effetti. Modificando il tipo di trattamento e sottoponendo i talli lichenici a cicli di idratazione/disidratazione simili a quelli che avvengono in condizioni naturali, è stata indagata la risposta di talli delle stesse specie a esposizioni prolungate di diverse settimane. In natura, infatti, gli ecosistemi sono più spesso interessati da eventi di stress cronico (concentrazioni relativamente basse di inquinanti per lunghi periodi) piuttosto che di stress acuto (alte concentrazioni per brevi periodi). I risultati hanno mostrato che in caso di esposizione prolungata non solo *E. prunastri*, ma anche *X. parietina* ha subito una parziale inibizione del fotosistema evidenziando l'importanza fondamentale del tempo di esposizione (Fig. 3, MUNZI *et al.*, 2010).

Una volta individuati i parametri idonei è stato necessario dimostrare che la risposta fisiologica può essere indotta da concentrazioni ecologicamente rilevanti di ammonio. Questo è stato fatto in uno studio recente (Tab. I, MUNZI *et al.*, 2012), esponendo talli di *E. prunastri* a concentrazioni di NH<sub>4</sub>Cl comprese tra 50 e 500 µM, corrispondenti a valori misurati nelle



**Fig. 3.** Fluorescenza della clorofilla *a* espressa come rapporto  $F_v/F_M$  ( $\pm$  DS) in *Evernia prunastri* (A) e *Xanthoria parietina* (B) esposte per 6 settimane a acqua deionizzata (controllo), nitrato d'ammonio 0,05 M e solfato d'ammonio 0,025 M (L=lunedì; M=mercoledì; 1-6= settimane di trattamento), da MUNZI *et al.*, 2010 (modificato).

**Tab. I.** Valori dell'indice di performance fotosintetica (PIabs  $\pm$  DS) e della fluorescenza della clorofilla *a* espressa come rapporto  $F_v/F_m$  nel lichene *E. prunastri* trattato con soluzioni 50, 150 e 500  $\mu$ M di  $NH_4Cl$ . I controlli sono stati trattati solo con acqua. I valori in grassetto sono statisticamente differenti dai controlli (da MUNZI *et al.*, 2012, modificato).

PIabs	Controllo	I settimana	II settimana	III settimana	IV settimana
H <sub>2</sub> O	0,524 $\pm$ 0,066	0,559 $\pm$ 0,065	0,527 $\pm$ 0,078	0,541 $\pm$ 0,043	0,502 $\pm$ 0,035
50 $\mu$ M	0,543 $\pm$ 0,056	0,541 $\pm$ 0,092	0,506 $\pm$ 0,064	<b>0,445 <math>\pm</math> 0,076</b>	<b>0,469 <math>\pm</math> 0,074</b>
150 $\mu$ M	0,548 $\pm$ 0,065	0,597 $\pm$ 0,099	0,523 $\pm$ 0,006	<b>0,469 <math>\pm</math> 0,084</b>	<b>0,453 <math>\pm</math> 0,078</b>
500 $\mu$ M	0,569 $\pm$ 0,054	0,564 $\pm$ 0,087	<b>0,476 <math>\pm</math> 0,058</b>	<b>0,437 <math>\pm</math> 0,129</b>	<b>0,464 <math>\pm</math> 0,093</b>

$F_v/F_m$	Controllo	I settimana	II settimana	III settimana	IV settimana
H <sub>2</sub> O	0,077 $\pm$ 0,030	0,072 $\pm$ 0,024	0,062 $\pm$ 0,027	0,072 $\pm$ 0,013	0,063 $\pm$ 0,026
50 $\mu$ M	0,084 $\pm$ 0,037	0,069 $\pm$ 0,041	0,059 $\pm$ 0,039	<b>0,039 <math>\pm</math> 0,022</b>	<b>0,044 <math>\pm</math> 0,022</b>
150 $\mu$ M	0,093 $\pm$ 0,039	0,092 $\pm$ 0,051	<b>0,041 <math>\pm</math> 0,018</b>	<b>0,040 <math>\pm</math> 0,028</b>	<b>0,043 <math>\pm</math> 0,030</b>
500 $\mu$ M	0,105 $\pm$ 0,046	<b>0,071 <math>\pm</math> 0,036</b>	<b>0,039 <math>\pm</math> 0,020</b>	<b>0,032 <math>\pm</math> 0,017</b>	<b>0,047 <math>\pm</math> 0,030</b>

precipitazioni in varie parti del mondo. I parametri analizzati in questo range di concentrazioni realistiche sono stati l'Indice di Performance fotosintetica (PIabs), il rapporto  $F_v/F_m$  e il danneggiamento delle membrane cellulari. L'Indice di Performance fotosintetica è il parametro che ha mostrato la maggiore sensibilità rispondendo con una diminuzione significativa già dopo una settimana di trattamento alla concentrazione più alta. Al contrario, la permeabilità di membrana non ha mostrato alterazioni in seguito a nessuno dei trattamenti. Questo risultato indica che i diversi parametri possono essere utilizzati in condizioni diverse: danneggiamento di membrana in caso di stress acuti e PIabs e  $F_v/F_m$  in caso di stress cronici.

Data la complessità dei processi che avvengono all'interno delle cellule, è necessario molto lavoro per stabilire una chiara relazione quali-quantitativa tra le risposte osservate e la concentrazione di composti azotati in atmosfera e lo studio della risposta fisiologica dei licheni si è rivelato un eccellente strumento di indagine in questa direzione. Molte ricerche hanno indagato i meccanismi di tolleranza all'azoto nei licheni, ma molte domande restano ancora in attesa di risposta (HAUCK, 2010). Il feedback positivo tra la tolleranza all'azoto e l'accresciuta capacità fotosintetica osservata in alcuni esperimenti (DAHLMAN *et al.*, 2003; GAIO-OLIVEIRA *et al.*, 2005) sembra indicare che la resistenza all'azoto implichi un'accresciuta disponibilità di carbonio e modificazioni dell'attività metabolica (HAUCK, 2010). Comparando specie nitrofile e oligotrofiche, GAIO-OLIVEIRA *et al.* (2001) hanno mostrato una correlazione significativa tra la capacità di scambio ionico e la sensibilità all'azoto. La specie sensibile *E. prunastri* mostrava infatti la più alta capacità di scambio ionico, mentre la specie tollerante *X. parietina* quella più bassa.

PIRINTSOS *et al.* (2009) hanno suggerito che le poliammine abbiano un ruolo importante nella modulazione della resistenza all'azoto dopo aver osservato che fornendo poliammine a una specie sensibile (*E. prunastri*) questa aumentava la sua resistenza ai trattamenti con azoto, mentre fornendo inibitori della produzione di poliammine a una specie resistente (*X. parietina*) questa aumentava la sua sensibilità.

Recenti risultati hanno mostrato che crescere in un ambiente con una grande disponibilità di azoto stimola in *X. parietina* lo sviluppo di meccanismi di resistenza che non si ritrovano in talli della stessa specie cresciuti in un ambiente con scarsa disponibilità di azoto (Fig. 4, MUNZI *et al.*, 2011). Questo suggerisce che la tolleranza all'azoto non sia solo una caratteristica specie-specifica, ma anche il risultato dell'influenza di fattori ambientali sull'attività metabolica dei licheni.

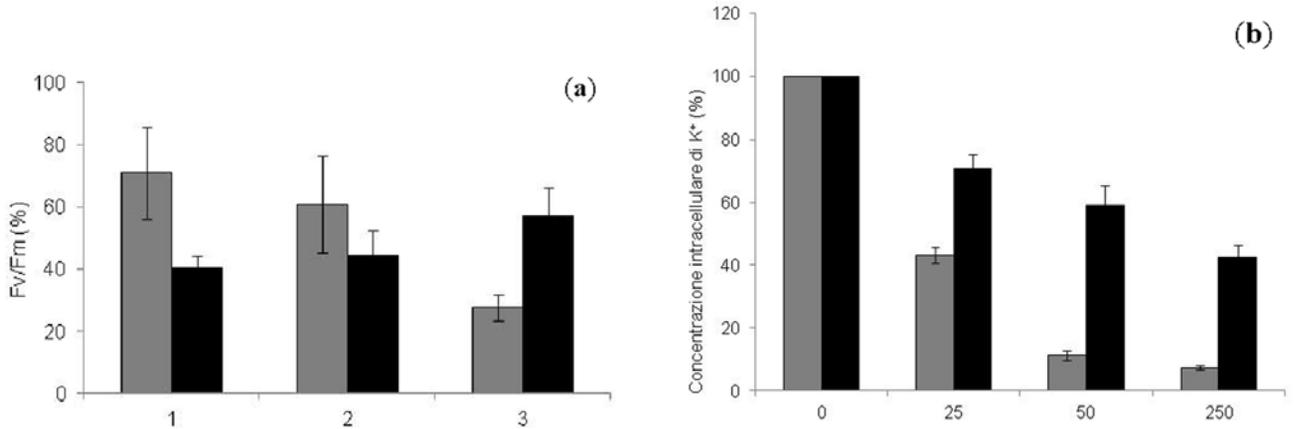
Promettenti risultati sono stati ottenuti anche attraverso esperimenti di trapianto intorno a sorgenti puntiformi di ammoniaca. Talli di *E. prunastri* e *Pseudevernia furfuracea* prelevati da un'area di controllo ed esposti intorno a un allevamento di ovini hanno evidenziato una riduzione delle performance fotosintetiche già dopo poche settimane, suggerendo un effetto diretto dell' $NH_3$  sulle risposte fisiologiche dei licheni e mostrando l'utilità dello studio dell'emissione di fluorescenza come indicatore degli effetti dell' $NH_3$  (Fig. 5, PAOLI *et al.*, 2010a).

Un esperimento condotto nei pressi di un allevamento di suini ha evidenziato come l' $NH_3$  determini un aumento delle specie nitrofile, un accumulo di N e un incremento nel pH delle scorze degli alberi con la diminuzione della distanza dalla fonte (FRATI *et al.*, 2007). Dei dati interessanti sono stati ottenuti anche in esperimenti di trapianto di specie N-sensibili (*E. prunastri*) e N-tolleranti (*X.*

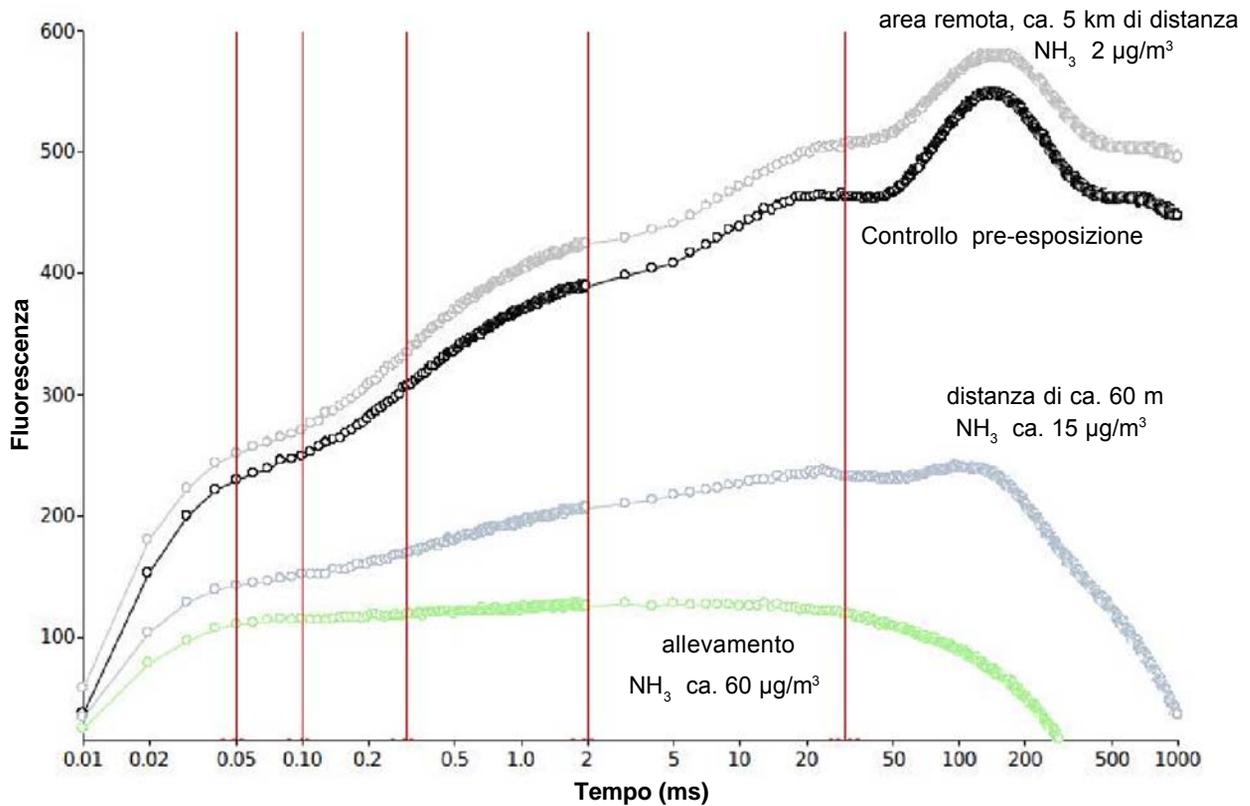
*parietina*) nei dintorni di una fonte di NH<sub>3</sub> (un impianto di compostaggio): l'analisi delle performance fotosintetiche dopo tre mesi di esposizione (Fig. 6) suggerisce un migliore adattamento della specie *X. parietina* (N-tollerante) esposta nei pressi dell'impianto rispetto ad *E. prunastri* (N-sensibile).

I risultati lasciano ipotizzare una possibile variazio-

ne nel corso degli anni anche nella struttura delle comunità licheniche, che attualmente sono caratterizzate dalla prevalenza di specie meso-acidofile, ma che potrebbero arricchirsi in specie xero-nitrofile in particolare in prossimità alla fonte di emissione. Ciò è dimostrato da vari studi effettuati nel nord Europa che evidenziano il ruolo dell'NH<sub>3</sub> nel determinare i



**Fig. 4.** Valori di F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (percentuale rispetto al controllo ± DS) in trattamenti ripetuti (1, 2 e 3) con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mM (a) e concentrazione intracellulare di potassio (percentuale rispetto al controllo) dopo trattamenti con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25, 50 e 250 mM (b) in talli di *X. parietina* provenienti da ambiente con bassa disponibilità di azoto (grigio) e talli provenienti da ambiente con alta disponibilità di azoto (nero) (da MUNZI *et al.*, 2011, modificato).



**Fig. 5.** Curve di emissione di fluorescenza clorofilliana in campioni di *Pseudevernia furfuracea* trapiantati a distanza crescente da un allevamento di ovini e relativi livelli di NH<sub>3</sub> in atmosfera (da PAOLI *et al.*, 2010a, modificato).

recenti cambiamenti nelle comunità licheniche, favorendo le specie nitrofile a discapito di quelle acidofile (VAN HERK, 1999). VAN HERK *et al.* (2001) hanno inoltre dimostrato che più che la biodisponibilità diretta di azoto, per i licheni sono composti azotati quali l'ammoniaca ad agire aumentando il pH delle scorze, che è un fattore di primaria importanza nel determinare le variazioni delle comunità licheniche (BARKMAN, 1958). Ciò spiega, fra l'altro, l'espansione della vegetazione di *Xanthorion*, caratterizzata da specie xerofite e tolleranti agli stress ambientali, avvenuta negli ultimi anni.

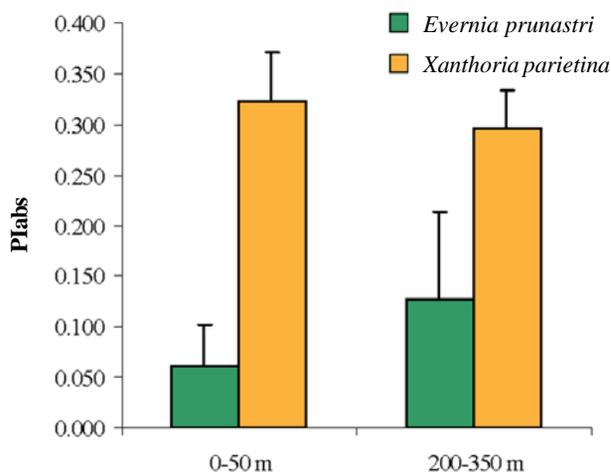
### MONITORAGGIO BIOLOGICO DEGLI EFFETTI DELL'INQUINAMENTO ATMOSFERICO INTORNO A SORGENTI PUNTIFORMI E DIFFUSE

I licheni possono offrire il loro contributo negli studi di valutazione dell'impatto ambientale di opere di pubblico interesse che potenzialmente rilasciano emissioni in atmosfera, ad esempio centrali per la produzione di energia elettrica, anche da fonti geotermiche, impianti per la lavorazione industriale, impianti per la gestione e lo smaltimento dei rifiuti. Ne sono esempi alcuni monitoraggi intorno a centrali elettriche e siti industriali (PAOLI e LOPPI, 2008; PAOLI *et al.*, 2006; 2011), cave e cementifici (BRANQUINHO *et al.*, 2008; LJUBIČ MLAKAR *et al.*, 2011), impianti di incenerimento e discariche (TRETIAČ *et al.*, 2011; PAOLI *et al.*, 2012a).

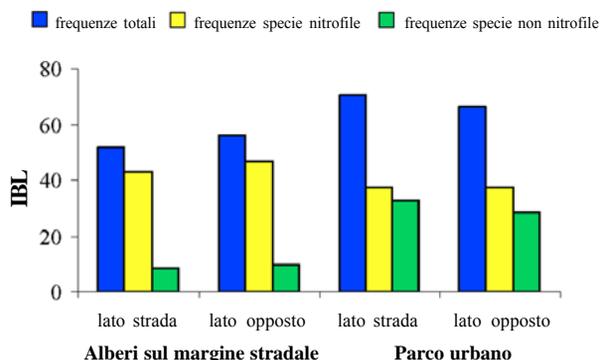
In particolare, il monitoraggio lichenico a lungo termine può fornire informazioni importanti per migliorare l'attuazione della valutazione d'impatto ambientale: nel corso di 14 anni di attività di una discarica in Toscana, la diversità dei licheni epifiti e l'accumulo di elementi in tracce in *Flavoparmelia caperata* sono stati utilizzati come indicatori di inquinamento. I licheni hanno rivelato un aumento della deposizione di alcuni elementi (Cd, Cr, Fe e Ni) e una diminuzione dell'IBL in siti direttamente esposti all'impianto (PAOLI *et al.*, 2012a). Tuttavia i dati hanno consentito di escludere un aumento significativo delle deposizioni di metalli pesanti nel territorio circostante, indicando come una gestione sostenibile del ciclo dei rifiuti possa essere associata al mantenimento di standard di qualità ambientale accettabili.

Il monitoraggio lichenico viene spesso utilizzato complementariamente alle misurazioni chimico-fisiche per valutare l'impatto di un'opera sulla qualità dell'aria; parimenti, i licheni possono rappresentare uno strumento biologico di valutazione positiva dell'efficacia di misure ed azioni intraprese allo scopo di recuperare e migliorare la qualità ambientale, ove queste azioni si riflettano positivamente sulla componente atmosferica e su parametri ai quali i licheni sono in grado di rispondere (es., abbattimento di uno specifico contaminante).

Utili informazioni ai fini della bioindicazione si ricavano anche analizzando gli effetti delle emissioni legate al traffico veicolare. Studi effettuati in aree urbane del centro Italia soggette ad elevata pressione veicolare segnalavano fino agli anni '90 una bassa biodiversità lichenica, accompagnata da un accumulo significativo di metalli pesanti nel lichene *F. caperata* (LOPPI *et al.*, 1994; 1995). La ripetizione a distanza di tempo delle indagini ha evidenziato una netta tendenza al miglioramento della qualità dell'aria: è quanto ad esempio è avvenuto nell'area urbana di Montecatini Terme (PT), con una ricolonizzazione lichenica progressiva e una riduzione delle deposizioni di metalli pesanti, soprattutto a seguito dell'abbattimento dei livelli di SO<sub>2</sub> e Pb grazie all'uso del metano negli impianti di riscaldamento e della benzina verde nel



**Fig. 6.** Indice di performance fotosintetica (PIabs ± DS) in trapianti di una specie sensibile (*Evernia prunastri*) e di una tollerante (*Xanthoria parietina*) all'azoto esposte per tre mesi a distanza crescente da un impianto di compostaggio.



**Fig. 7.** Effetto della distanza da una strada a elevato traffico veicolare nell'area urbana di Siena. Indice di Biodiversità Lichenica (IBL) su alberi presso il margine stradale e in un limitrofo parco urbano (da PAOLI *et al.*, 2012b, modificato).

parco veicolare (LOPPI *et al.*, 2004). Un recente studio effettuato nell'area urbana di Siena ha mostrato come la biodiversità lichenica aumenti in termini di IBL (e di ricchezza di specie) con la distanza da strade ad alta densità di traffico (Fig. 7, PAOLI *et al.*, 2012b).

Avvicinandosi a strade trafficate, si osserva una diminuzione delle specie acidofile, mentre i licheni nitrofilo tendono a colonizzare gli alberi più prossimi alle emissioni veicolari (PAOLI *et al.*, 2012b). Nel complesso l'IBL è simile sul lato esposto alla strada e sul lato opposto dell'albero. I principali traccianti del traffico, fra cui gli elementi Ba, Cr, Cu, Mn, Sb e Zn mostrano concentrazioni più elevate in talli di *Punctelia borrieri* asportati dagli alberi lungo la strada indipendentemente dall'esposizione angolare al flusso veicolare. Elementi terrigeni come V e Al aumentano invece con la distanza dal traffico. L'esposizione angolare non influenza in maniera significativa l'accumulo di elementi (PAOLI *et al.*, 2012b), confermando i risultati di precedenti studi su scorze e foglie di alberature stradali (BARGAGLI, 1998).

Ricerche effettuate in ambienti semi-aridi dell'Italia meridionale in prossimità di aree industriali hanno evidenziato come circa il 90% dell'IBL misurato dipenda dalla presenza di specie xero-nitrofile, per loro natura più tolleranti agli stress ambientali e indicatrici di eutrofizzazione (PAOLI *et al.*, 2006; 2011). Ben noto è il fatto che, al pari dell'inquinamento atmosferico, la diversità lichenica risulta influenzata da una molteplicità di fattori, quali il clima, il substrato di crescita, l'uso del suolo (BARKMAN, 1958), il cui effetto combinato sulla struttura e composizione delle comunità licheniche è particolarmente esacerbato in ambiente mediterraneo arido. In queste condizioni, diviene più complesso individuare il segnale di uno stress ambientale legato all'inquinamento rispetto a quello legato alle caratteristiche intrinseche dell'area di studio. Se l'inquinamento è marcato e prolungato nel tempo, esso va a insistere su specie mediamente resistenti, per cui è ipotizzabile osservare nel lungo periodo la scomparsa anche di queste specie; al contrario, se le concentrazioni di inquinanti sono basse, possono favorire la diffusione dei licheni nitrofilo ed aumentare l'IBL complessivo, per cui il segnale da ricercare è proprio l'ulteriore incremento delle specie nitrofile. Nonostante questo aspetto, in un'area industriale del basso Molise è stato effettuato un esperimento di trapianto con *E. prunastri* che ha consentito di individuare segnali di stress nei campioni dopo tre mesi di esposizione attraverso la misura della conducibilità elettrica, che è risultata inversamente correlata con la diversità dei licheni epifiti misurata nelle stesse stazioni (PAOLI *et al.*, 2011).

Oltre che dagli NO<sub>x</sub> rilasciati nei processi di combustione, sia di origine veicolare che industriale, le specie nitrofile sono favorite anche da altri inquinanti azotati, come NH<sub>3</sub> (VAN HERK, 1999). Le emissioni di NH<sub>3</sub> derivano principalmente dal settore agricolo, in particolare dagli allevamenti di bestiame e dai processi di fertilizzazione, ma sono prodotte anche da processi industriali e dall'utilizzo di combustibili fossili. Il crescente uso di marmitte catalitiche, ad esempio, ha portato a un incremento delle emissioni di NH<sub>3</sub> dovute al traffico veicolare, a causa delle condizioni riducenti che si creano all'interno del convertitore catalitico, in particolare a motore freddo. Quando il motore non funziona a pieno regime, come avviene nel traffico cittadino, i catalizzatori emettono NH<sub>3</sub> che pertanto può raggiungere elevate concentrazioni in ambiente urbano (SUTTON *et al.*, 2000; CAPE *et al.*, 2004). Tutte queste evidenze suggeriscono come le comunità licheniche reagiscono in modo diverso rispetto al periodo in cui gli inquinanti principali erano gli ossidi di zolfo, ed è pertanto necessario adattare il modo di valutare i dati raccolti negli studi di bioindicazione.

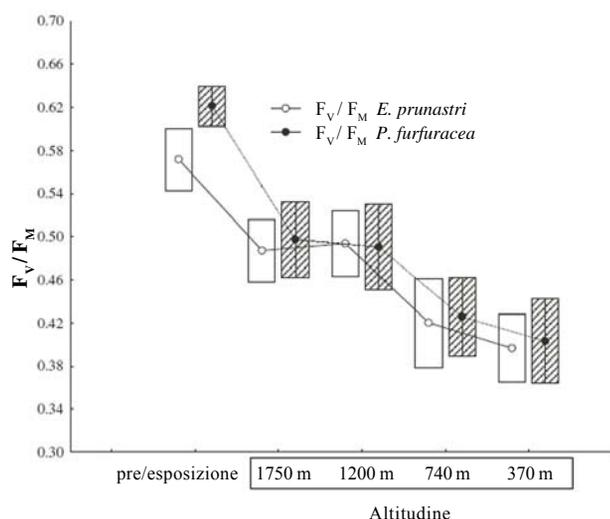
I licheni più oligotrofici, igrofilo e acidofilo sono estremamente sensibili all'inquinamento causato dal traffico veicolare e se ne può osservare il declino in prossimità di strade intensamente trafficate (LOPPI *et al.*, 2012). La stessa considerazione vale in generale anche per le emissioni associate ai processi di combustione dovuti alle attività industriali. Negli studi di bioindicazione tramite licheni, è necessario tenere in considerazione che avvicinandosi alle strade intensamente trafficate, o a un'area industriale, le specie non-nitrofile diminuiscono e la frazione delle specie nitrofile può aumentare considerevolmente senza che questo corrisponda ad un reale miglioramento delle condizioni ambientali. Questi gruppi di specie sono definiti "*functional response groups*", vale a dire gruppi funzionali di specie, ovvero organismi che rispondono allo stesso modo a un determinato fattore ambientale (LAVOREL e GARNIER, 2002). Recenti studi suggeriscono che il loro utilizzo come indicatori di risposta in ambiente urbano sia più utile del calcolo della biodiversità totale (LOPPI *et al.*, 2012). Le stesse considerazioni emergono nel monitoraggio degli effetti delle emissioni geotermiche: con il progressivo abbattimento dei livelli di idrogeno solforato, i licheni rispondono in maniera più diretta alla frazione ammoniacale di queste emissioni e come suggerito da LOPPI e NASCIBENE (2010), in presenza di emissioni di composti azotati, la risposta delle specie nitrofile dovrebbe essere considerata separatamente nel calcolo degli indici di biodiversità lichenica.

Tale approccio è suggerito sia nelle linee guida tedesche (VDI-3957, 2005), sia in monitoraggi liche-

nologici volti a valutare in maniera specifica gli effetti dell'eutrofizzazione degli habitat sulla biodiversità lichenica (RUISSI *et al.*, 2005). In particolare, nelle linee guida VDI, il calcolo dell'IBL basato sulle specie oligotrofiche (*reference species*) è utilizzato come indicatore di qualità dell'aria e il contributo delle specie nitrofile come indicatore specifico del livello di eutrofizzazione ambientale. Questo aspetto interessante necessita di ulteriori studi che consentano di utilizzare in maniera ancora più proficua le informazioni ottenute dallo studio dei licheni come bioindicatori.

### LICHENI E PARAMETRI CLIMATICI

I licheni sono sensibili alle variazioni dei parametri climatici (KAPPEN, 1988; INSAROV e INSAROVA, 1996; INSAROV e SCHROETER, 2002) e rispondono al riscaldamento globale degli ecosistemi (VAN HERK *et al.*, 2002). Attraverso la tecnica del trapianto è possibile simulare cambiamenti delle condizioni ambientali e quindi anche dei vari parametri microclimatici. Usualmente vengono indagati gli effetti dei parametri climatici sul metabolismo lichenico nel breve e nel lungo periodo, registrando le risposte indotte in seguito a variazioni dell'irraggiamento solare, dell'intensità della luce ultravioletta, della disponibilità idrica e della temperatura, nonché simulando cambiamenti climatici lungo gradienti regionali di altitudine e distanza dal mare (es., CZECZUGA, 1981; HAMADA, 1981; BACHEREAU e ASTA, 1997; BJERKE *et al.*, 2003; SOLHAUG *et al.*, 2003; PAOLI *et al.*, 2010b; PIRINTSOS *et al.*, 2011).



**Fig. 8.** Emissioni di fluorescenza della clorofilla *a* espressa come rapporto  $F_v/F_m$  (box = errore standard) in trapianti di *E. prunastri* e *P. furfuracea* lungo un gradiente altitudinale di 1400 m nell'isola di Creta. I dati mostrano una riduzione dell'attività fotosintetica dalle aree montane verso le zone più aride a bassa quota (da PIRINTSOS *et al.*, 2011, modificato).

In un esperimento condotto sull'isola di Creta è stato simulato un cambiamento climatico trapiantando i licheni *E. prunastri* e *P. furfuracea* lungo un gradiente altitudinale di 1400 m e sono stati registrati mensilmente i valori delle performance fotosintetiche e il contenuto dei pigmenti (PIRINTSOS *et al.*, 2011). I dati hanno mostrato per entrambe le specie una depressione dell'attività fotosintetica, dell'integrità della clorofilla e della concentrazione dei pigmenti lungo il gradiente procedendo dalle aree montane umide verso i siti più aridi di bassa quota (Fig. 8). Nelle condizioni sperimentali, la disponibilità idrica sembra il fattore determinante nell'indurre differenze nelle performance fotosintetiche delle due specie.

In questo contesto, ricordando che i licheni offrono un punto di vista specifico sull'ambiente atmosferico, i risultati ottenuti suggeriscono che l'ecofisiologia dei licheni merita ricerche più approfondite come indicatore precoce di stress atmosferico indotto dalle condizioni di aridità, e, in senso più ampio, come strumento per lo studio del rischio di desertificazione in ambiente mediterraneo.

Le caratteristiche della fascia fitoclimatica sono in grado di influenzare le potenzialità di sviluppo delle comunità licheniche: in termini di IBL ciò si esprime nel fatto che in condizioni di "assenza" di inquinamento le aree solitamente più umide fanno registrare valori di IBL più elevati (specialmente dove avviene la compenetrazione fra comunità licheniche diverse) rispetto a zone per loro natura più aride. Le condizioni di xerofitismo che caratterizzano la fascia mediterranea arida sono un fattore che può limitare lo sviluppo potenziale delle comunità licheniche a prescindere da altri stress antropici. In altri termini, i valori di "normalità" dell'IBL in ambienti aridi risultano inferiori rispetto a quelli massimi potenziali che si possono registrare in ambienti più umidi e non è pertanto semplice confrontare aree climaticamente diverse fra loro.

In generale, ai fini della bioindicazione, ne consegue che alcuni parametri ecofisiologici possono essere stimati allo scopo di differenziare il comportamento delle specie licheniche in relazione sia ai gradienti climatici, sia combinando i gradienti climatici con l'inquinamento atmosferico, in modo da separarne gli effetti e caratterizzare all'atto pratico il comportamento delle specie in assenza e in presenza di sorgenti di inquinamento. Tale aspetto è molto importante per la ricerca: poiché i licheni rispondono alle condizioni ambientali nel loro complesso, bisogna considerare che quando lo scopo è quello di registrarne le risposte per valutare gli effetti dell'inquinamento atmosferico (segnale), è necessario separarne l'effetto delle condizioni ambientali di base (rumore di fondo).

## BIBLIOGRAFIA

- ANPA, 2001. I. B. L. Indice di Biodiversità Lichenica. Manuali e Linee Guida 2/2001.
- ASTA J., ERHARDT W., FERRETTI M., FORNASIER F., KIRSCHBAUM U., NIMIS P.L., PURVIS O.W., PIRINTOS S.A., 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*. Kluwer Academic Publishers: 273-279.
- BACHEREAU F., ASTA J., 1997 – Effects of solar ultraviolet radiation at high altitude on the physiology and the biochemistry of a terricolous lichen (*Cetraria islandica* (L.) Ach.). *Symbiosis*, **23**: 197-217.
- BAČKOR M., 2011. *Lichens and heavy metals: toxicity and tolerance*. Pavol Jozef Šafárik University in Košice (Slovakia), 130 pp.
- BAČKOR M., FAHSELT D., 2005. Tetrazolium reduction as an indicator of environmental stress in lichens and isolated biots. *Environmental and Experimental Botany*, **53**: 125-133.
- BAČKOR M., ZETÍKOVÁ J., 2003. Effects of copper, cobalt and mercury on the chlorophyll content of lichens *Cetraria islandica* and *Flavocetraria cucullata*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, **93**: 175-187.
- BAČKOR M., KOVÁĚIK J., PIOVÁR J., PISANI T., LOPPI S., 2010. Physiological aspects of cadmium and nickel toxicity in the lichens *Peltigera rufescens* and *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis*. *Water Air and Soil Pollution*, **207**: 253-262.
- BARGAGLI R., 1998. *Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*. Springer, Berlin, 324 pp.
- BARGAGLI R., 2006. Monitoraggio degli inquinanti atmosferici persistenti mediante i muschi e le piante superiori. *Biologia Ambientale*, **20**: 55-67.
- BARKMAN J.J., 1958. *Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes*. Assen, The Netherlands, 508 pp.
- BIERKE J.W., ZIELKE M., SOLHEIM B., 2003 – Long-term impacts of simulated climatic change on secondary metabolism, thallus structure and nitrogen fixation activity in two cyanolichens from the Arctic. *New Phytologist*, **159**: 361-367.
- BRANQUINHO C., BROWN D.H., CATARINO F., 1997. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environmental Experimental Botany*, **38**: 165-179.
- BRANQUINHO C., GAIO-OLIVEIRA G., AUGUSTO S., PINHO P., MÁGUAS C., CORREIA O., 2008. Biomonitoring spatial and temporal impact of atmospheric dust from a cement industry. *Environmental Pollution*, **151**: 292-299.
- CAPE J.N., TANG Y.S., VAN DIJK N., LOVE L., SUTTON M.A., PALMER S.C.F., 2004. Concentrations of ammonia and nitrogen dioxide at roadside verges, and their contribution to nitrogen deposition. *Environmental Pollution*, **132**: 469-478.
- CZECZUGA B., 1981. The effect of light on the content of photosynthetically active pigments in plants. III The effect of short rays of the visible spectrum on the chlorophyll and carotenoids content of lichens. *Nova Hedwigia*, **35**: 371-376.
- DAHLMAN L., PERSSON J., NÄSHOLM T., PALMQVIST K., 2003. Carbon and nitrogen distribution in the green-algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta*, **217**: 41-48.
- DAVIES L., BATES J.W., BELL J.N.B., JAMES P.W., PURVIS O.W., 2007. Diversity and sensitivity of epiphytes to oxides of nitrogen in London. *Environmental Pollution*, **146**: 299-310.
- FERRY B.W., BADDELEY M.S., HAWKSWORTH D.L., (Eds). 1973. *Air Pollution and Lichens*. London: Athlone Press, 389 pp.
- FRATI L., BRUNIALTI G., LOPPI S., 2008. Effects of reduced nitrogen compounds on epiphytic lichen communities in Mediterranean Italy. *Science of the Total Environment*, **407**: 630-637.
- FRATI L., SANTONI S., NICOLARDI V., GAGGI C., BRUNIALTI G., GUTTOVÁ A., GAUDINO S., PATI A., PIRINTOS S.A., LOPPI S., 2007. Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. *Environmental Pollution*, **146**: 311-316.
- GALLOWAY J.N., 1998. The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental Pollution*, **102**: 15-24.
- GAIO-OLIVEIRA G., BRANQUINHO C., MÁGUAS C., MARTINS-LOUÇAO M.A., 2001. The concentration of nitrogen in nitrophilous and non-nitrophilous lichen species. *Symbiosis*, **31**: 187-199.
- GAIO-OLIVEIRA G., DAHLMAN L., PALMQVIST K., MARTINS-LOUÇAO M.A., MÁGUAS C., 2005. Nitrogen uptake in relation to excess supply and its effects on the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Planta*, **220**: 794-803.
- GARTY J., KARARY Y., HAREL J., 1993. The impact of air pollution on the integrity of cell membranes and chlorophyll in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. transplanted to industrial sites in Israel. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **24**: 455-460.
- GARTY J., TAMIR O., HASSID I., ESHEL A., COHEN Y., KARNIELI A., ORLOVSKY L., 2001. Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance in lichens exposed to air pollution. *Journal of Environmental Quality*, **30**: 884-893.
- GEISER L.H., JOVAN S.E., GLAVICH D.A., PORTER M.K., 2010. Lichen-based critical loads for atmospheric nitrogen deposition in Western Oregon and Washington Forests, USA. *Environmental Pollution*, **158**: 2412-2421.
- GOMBERT S., ASTA J., SEAWARD M.R.D., 2004. Assessment of lichen diversity by index of atmospheric purity (IAP), index of human impact (IHI) and other environmental factors in an urban area (Grenoble, southeast France). *Science of the Total Environment*, **324**: 183-199.
- GONZÁLES C.M., PIGNATA M.L., 1994. The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulphur and heavy metals in a transplanted lichen. *Chemical Ecology*, **9**: 105-113.
- GONZÁLES C.M., PIGNATA M.L., 1997. Chemical response of the lichen *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog transplanted

- close to a power station in an urban-industrial environment. *Environmental Pollution*, **97**: 195-203.
- GRINDON L.H., 1859. *The Manchester Flora*. London, UK, White, 575 pp.
- GRUBER N., GALLOWAY J.N., 2008. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, **451**: 293-296.
- HAMADA N., 1981. The effect of temperature on the content of the medullary depsidone salazinic acid in *Ramalina siliquosa* (lichens). *Canadian Journal of Botany*, **60**: 383-385.
- HAUCK M., 2010. Ammonium and nitrate tolerance in lichens. *Environmental Pollution*, **158**: 1127-1133.
- KAPPEN L., 1988. Ecophysiological relationships in different climatic regions. In: Galun M. (ed.) *Handbook of lichenology*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida: 37-99.
- KRICKE R., LOPPI S., 2002. Bioindication: the I.A.P. approach. In: Nimis P.L., Scheidegger C. e Wolseley P.A. (eds), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 21-37.
- INSAROV G., INSAROVA I., 1996. Assessment of lichen sensitivity to climate change. *Israel Journal of Plant Science*, **44**: 309-334.
- INSAROV G., SCHROETER B., 2002. Lichen monitoring and climate change. In: NIMIS P.L., SCHEIDEGGER C., WOLSELEY P.A. (eds), *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. NATO Science Series – Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 183-201.
- LAVOREL S., GARNIER E., 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**: 545-556.
- LOP E., PINHO P., MATOS P., PEREIRA M.J., BRANQUINHO C., 2012. The use of lichen functional groups as indicators of air quality in a Mediterranean urban environment. *Ecological Indicators*, **13**: 215-221.
- LOPPI S., DE DOMINICIS V., 1996. Effects of agriculture on epiphytic lichen vegetation in Central Italy. *Israel Journal of Plant Science*, **44**: 297-307.
- LOPPI S., NASCIBENE J., 2010. Monitoring H<sub>2</sub>S air pollution caused by the industrial exploitation of geothermal energy: the pitfall of using lichens as bioindicators. *Environmental Pollution*, **158**: 2635-2639.
- LOPPI S., PIRINTSOS S.A., 2000. Effect of dust on epiphytic lichen vegetation in the Mediterranean area (Italy and Greece). *Israel Journal of Plant Science*, **48**: 91-95.
- LOPPI S., CHITI F., CORSINI A., BERNALDI L., 1994. Lichen biomonitoring of trace metals in the Pistoia area (central-northern Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, **24**: 17-27.
- LOPPI S., CORSINI A., BRUSCOLI C., ROSSETTI C., 1995. Lichen biomonitoring of heavy metals in Montecatini Terme (central-northern Italy). *Micologia e Vegetazione Mediterranea*, **10**: 122-128.
- LOPPI S., FRATI L., PAOLI L., BIGAGLI V., ROSSETTI C., BRUSCOLI C., CORSINI A., 2004. Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of the Total Environment*, **326**: 113-122.
- LOPPI S., GIORDANI P., BRUNIALTI G., ISOCRONO D., PIERVITTORI R., 2002. Identifying deviations from naturality of lichen diversity for bioindication purposes. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P.A. (Eds). *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. NATO Science Series – Kluwer Academic Publishers, 281-284.
- MAXWELL K., JOHNSON G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 659-668.
- LJUBIČ MLAKAR T., KOTNIK J., JERAN Z., VUK T., MRAK T., FAJON V., 2011. Biomonitoring with epiphytic lichens as a complementary method for the study of mercury contamination near a cement plant. *Environmental Monitoring Assessment*, **181**: 225-241.
- MUNZI S., PISANI T., LOPPI S., 2009. The integrity of lichen cell membrane is a suitable parameter for monitoring early biological effects of acute nitrogen pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 2009-2012.
- MUNZI S., PISANI T., PAOLI L., LOPPI S., 2010. Time- and dose-dependency of the effects of nitrogen pollution on lichens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1785-1788.
- MUNZI S., LOPPI S., CRUZ C., BRANQUINHO C., 2011. Do lichens have “memory” of their native nitrogen environment? *Planta*, **233**: 333-342.
- MUNZI S., PAOLI L., FIORINI E., LOPPI S., 2012. Physiological response of the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. to ecologically relevant nitrogen concentrations. *Environmental Pollution*, (in press).
- NIMIS P.L., SCHEIDEGGER C., WOLSELEY P.A., 2002. *Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens*. NATO Science Series - Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 408 pp.
- NYLANDER, W. 1866. Les lichens du Jardin du Luxembourg. *Bulletin Société Botanique de France*, **13**: 364-372.
- PAOLI L., GUTTOVÁ A., LOPPI S., 2006. Assessment of environmental quality by the diversity of epiphytic lichens in a semi-arid mediterranean area (Val Basento, South Italy). *Biologia*, **61**: 353-359.
- PAOLI L., CORSINI A., BIGAGLI V., VANNINI J., BRUSCOLI C., LOPPI S., 2012a. Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. *Environmental Pollution*, **161**: 70-75.
- PAOLI L., LOPPI S., 2008. A biological method to monitor early effects of the air pollution caused by the industrial exploitation of geothermal energy. *Environmental Pollution*, **155**: 383-388.
- PAOLI L., MUNZI S., FIORINI E., GAGGI C., LOPPI S., 2012b. Influence of angular exposure and proximity to vehicular traffic on the diversity of epiphytic lichens and the bioaccumulation of traffic-related elements. *Environmental Science and Pollution Research*, (in press, DOI 10.1007/s11356-012-0893-1).
- PAOLI L., PIRINTSOS S.A., KOTZABASIS K., PISANI T., NAVAKOUDIS E., LOPPI S., 2010a. Effects of ammonia from livestock farming on lichen photosynthesis. *Environmental Pollution*, **158**: 2258-2265.
- PAOLI L., PISANI T., GUTTOVÁ A., SARDELLA G., LOPPI S., 2011.

- Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: Relationship with the lichen diversity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**: 650-657.
- PAOLI L., PISANI T., MUNZI S., GAGGI C., LOPPI S., 2010b. Influence of sun irradiance and water availability on lichen photosynthetic pigments during a Mediterranean summer. *Biologia*, **65**: 776-783.
- PEARSON L.C., HENRIKSSON E., 1981. Air pollution damage to cell membranes in lichens. II. Laboratory experiments. *The Bryologist*, **84**: 515-520.
- PINHO P., THEOBALD M.R., DIAS T., TANG Y.S., CRUZ C., MARTINS-LOUÇÃO M.A., MÁGUAS C., SUTTON M., BRANQUINHO C., 2012. Critical loads of nitrogen deposition and critical levels of atmospheric ammonia for semi-natural Mediterranean evergreen woodlands. *Biogeosciences*, **9**: 1205-1215.
- PIRINTSOS S.A., LOPPI S., DALAKA A., DE DOMINICIS V., 1998. Effects of grazing on epiphytic lichen vegetation in a Mediterranean mixed evergreen sclerophyllous and deciduous shrubland (northern Greece). *Israel Journal of Plant Science*, **46**: 303-307.
- PIRINTSOS S.A., MUNZI S., LOPPI S., KOTZABASIS K., 2009. Do polyamines alter the sensitivity of lichens to nitrogen stress? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 1331-1336.
- PIRINTSOS S.A., PAOLI L., LOPPI S., KOTZABASIS K., 2011. Photosynthetic performance of lichen transplants as early indicator of climatic stress along an altitudinal gradient in the arid Mediterranean area. *Climatic Change*, **107**: 305-328.
- PISANI T., MUNZI S., PAOLI L., BAČKOR M., LOPPI S., 2009. Physiological effects of a geothermal element: boron excess in the epiphytic lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Chemosphere*, **76**: 921-926.
- PISANI T., MUNZI S., PAOLI L., BAČKOR M., LOPPI S., 2011a. Physiological effects of arsenic in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Chemosphere*, **82**: 963-969.
- PISANI T., MUNZI S., PAOLI L., BAČKOR M., KOVÁEK J., PIOVÁR J., LOPPI S., 2011b. Physiological effects of mercury in the lichens *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss and *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. *Chemosphere*, **82**: 1030-1037.
- ROCKSTRÖM J., STEFFEN W., NOONE K., PERSSON Å., CHAPIN III F.S., LAMBIN E.F., LENTON T.M., SCHEFFER M., FOLKE C., SCHELLNHUBER H.J., NYKVIST B., DE WIT C.A., HUGHES T., VAN DER LEEUW S., RODHE H., SÖRLIN S., SNYDER P.K., COSTANZA R., SVEDIN U., FALKENMARK M., KARLBERG L., CORELL R.W., FABRY V.J., HANSEN J., WALKER B., LIVERMAN D., RICHARDSON K., CRUTZEN P., FOLEY J.A., 2009. A safe operating space for humanity. *Nature*, **461**: 472-475.
- RUOSS E., 1999. How agriculture affects lichen vegetation in central Switzerland. *The Lichenologist*, **31**: 63-73.
- RUISSI S., ZUCCONI L., FORNASIER F., PAOLI L., FRATI L., LOPPI S., 2005. Mapping environmental effects of agriculture with epiphytic lichens. *Israel Journal of Plant Sciences*, **53**: 115-124.
- SEAWARD M.R.D., 1993. Lichens and sulphur dioxide air pollution: field studies. *Environmental Reviews*, **1**: 73-91.
- SIMON E.W., 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, **73**: 377-420.
- SOLHAUG K.A., GAUSLAA Y., NYBAKKEN L., BILGER W., 2003. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New phytologist*, **158**: 91-100.
- STRASSER R.J., SRIVASTAVA A., TSMILLI-MICHAEL M., 2000. The fluorescent transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M., Pathre U., Mohanty P., (eds), Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation 25. Taylor and Francis, London, UK: 445-483.
- STULEN I., PEREZ-SOBA M., DE KOK L.J., VAN DER EERDEN L., 1998. Impact of gaseous nitrogen deposition on plant functioning. *New Phytologist*, **139**: 61-70.
- SUTTON M.A., DRAGOSITS U., TANG Y.S., FOWLER D., 2000. Ammonia emissions from non-agricultural sources in the UK. *Atmospheric Environment*, **34**: 855-869.
- TRETIACH M., CANDOTTO CARNIEL F., LOPPI S., CARNIEL A., BORTOLUSSI A., MAZZILIS D., DEL BIANCO C., 2011. Lichen transplants as a suitable tool to identify mercury pollution from waste incinerator: a case study from NE Italy. *Environmental Monitoring and Assessment*, **175**: 589-600.
- VAN HERK C.M., 1999. Mapping of ammonia pollution with epiphytic lichens in the Netherlands. *The Lichenologist*, **31**: 9-20.
- VAN HERK C.M., 2001. Bark pH and susceptibility to toxic air pollutants as independent causes to changes in epiphytic lichen composition in space and time. *The Lichenologist*, **33**: 419-441.
- VAN HERK C.M., APTROOT A., VAN DOBBEN H.F., 2002. Long-term monitoring in the Netherlands suggests that lichens respond to global warming. *The Lichenologist*, **34**: 141-154.
- VDI-3957, 2005. Biological measurement procedures for determining and evaluating the effects of ambient air pollution by means of lichens (bioindication). Mapping the diversity of epiphytic lichens as an indicator of environmental quality. VDI-3957. Part 13. Issue German/English.
- WOLSELEY P.A., JAMES P.W., PURVIS O.W., LEITH I.D., SUTTON M.A., 2004. Bioindicator methods for nitrogen based on community species composition: lichens. In: Sutton M.A., Pitcairn C.E.R., Whitfield C.P. (eds), *Bioindicator and biomonitoring methods for assessing the effects of atmospheric nitrogen on statutory nature conservation sites*. JNCC Report No 356: 75-86.