

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA STRUTTURALE E FUNZIONALE

**DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA
INDIRIZZO ECOLOGIA E MICROBIOLOGIA
XX CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**Accumulo di IPA in foglie di leccio e loro degradazione
durante il processo di decomposizione**

Coordinatore

CH. MA PROF.SSA

AMALIA VIRZO DE SANTO

Candidata

DOTT.SSA

CLAUDIA LANCELLOTTI

Tutore

CH. MA PROF.SSA

ANNA ALFANI

Anno Accademico 2006-2007

*Una volta
mi hai chiesto
di comporre una poesia
per te.
Non l'ho mai fatto,
ma ora ti dedico
la mia tesi di dottorato.*

*A te, papà, con tutto il cuore.
Perché la fine della vita
non è la fine dell'amore.*

Claudia

Indice

Premessa	1
1. Inquinamento atmosferico	3
1.1 Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	8
<i>Origine, proprietà, fonti di emissione</i>	8
1.2 Tossicità degli IPA	12
1.3 Normativa sugli IPA in Europa	14
1.4 Gli IPA in atmosfera	15
2. Il biomonitoraggio	18
2.1 Accumulo di IPA nelle foglie	20
2.2 Ciclo degli IPA in natura	26
3. La decomposizione	28
3.1 Le fasi e gli organismi coinvolti	28
3.2 Lo studio della decomposizione	32
Scopo della ricerca	34
Materiali e metodi	36
4. Analisi di foglie di leccio	36
4.1 Il leccio	36
4.2 Siti di campionamento	39
4.3 Prelievo in campo e trattamento dei campioni	45
4.4 Determinazione dei lipidi	45
4.5 Determinazione degli IPA	46
4.6 Cenni di gas-cromatografia e di rilevazione mediante spettrometria di massa	54
5. Trattamento dei campioni e metodologie impiegate nello studio della decomposizione della lettiera di foglie	56

6. Trattamento statistico dei dati	59
Risultati e discussione	60
7. Analisi di IPA in foglie di leccio in aree urbane, industriali e remote	60
7.1 Accumulo degli IPA: influenza del contenuto lipidico e dell'età delle foglie	60
<i>Contenuto lipidico nelle foglie di leccio</i>	60
<i>Accumulo di IPA in funzione del contenuto in lipidi delle foglie</i>	61
<i>Accumulo di IPA in funzione dell'età delle foglie</i>	62
7.2 Gradienti spaziali di contaminazione e profilo degli IPA	66
7.3 Variazione del contenuto di IPA nelle foglie senescenti di siti contaminati	74
8. Dinamica della decomposizione della lettiera di foglie di leccio ad elevato contenuto di IPA	78
8.1 Analisi degli IPA in foglie dopo stabilizzazione all'aria	78
8.2 Decomposizione della lettiera di foglie	82
8.3 Dinamica degli IPA durante la decomposizione della lettiera di foglie	87
Conclusioni	94
Bibliografia	96
Ringraziamenti	111

Premessa

Negli ultimi decenni risultano notevolmente aumentati i casi di patologie legate all'inquinamento atmosferico.

Molte ricerche attribuiscono ad una specifica classe di inquinanti, gli Idrocarburi Policiclici Aromatici, noti con l'acronimo IPA, un ruolo prioritario tra le cause di rischi oncogeni.

A seguito di queste evidenze scientifiche nel 1999, la Commissione Europea ha appositamente creato un gruppo di lavoro per riconsiderare tutte le implicazioni relative a tali inquinanti e fornire delle linee guida per la definizione di standard di qualità dell'aria, indicando le strategie di valutazione e raccomandandone il monitoraggio.

Gli IPA rilasciati in aria, essenzialmente da sorgenti antropiche mobili quali autovetture, autobus, camion e ciclomotori piuttosto che da fonti stazionarie quali gli scarichi industriali, diffondono velocemente e possono permanere in atmosfera per periodi variabili, da minuti a giorni.

La deposizione di IPA determina un loro accumulo nelle piante. Pertanto, sempre più spesso vengono impiegate piante vascolari per il monitoraggio degli inquinanti atmosferici su larga scala, scegliendo specie con ampio areale di distribuzione e soprattutto in grado di svilupparsi anche in ambienti a forte impatto antropico.

Tra le diverse specie arboree che si prestano a studi di questo genere, il leccio (*Quercus ilex* L.) risulta particolarmente indicato in quanto tipico dell'ambiente mediterraneo e ampiamente diffuso in siti urbani e industriali oltre che in aree remote. Tale specie, inoltre, risulta particolarmente idonea per lo studio dell'accumulo di inquinanti organici, quali gli idrocarburi policiclici aromatici, per le caratteristiche morfologiche delle foglie.

Ciò ha rappresentato il punto di partenza della nostra ricerca: biomonitorare gli IPA accumulati in foglie di leccio in siti a diverso impatto nella Regione Campania relazionando l'accumulo di questi inquinanti alle caratteristiche morfologiche e chimiche della specie impiegata come *biomonitore*.

L'importanza di questa ricerca risiede inoltre nell'approfondimento di una tematica non ancora chiara né ben sviluppata in letteratura: lo studio cioè del destino degli IPA dopo la deposizione e l'accumulo nelle foglie, in particolare durante la senescenza delle foglie e la decomposizione della lettiera.

1. Inquinamento atmosferico

L'inquinamento atmosferico è stato definito come "*ogni modificazione della normale composizione o stato fisico dell'aria atmosferica, dovuta alla presenza nella stessa di una o più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da alterare le normali condizioni ambientali e di salubrità dell'aria; da costituire pericolo ovvero pregiudizio diretto o indiretto per la salute dell'uomo; da compromettere le attività ricreative e gli altri usi legittimi dell'ambiente; da alterare le risorse biologiche ed i beni materiali pubblici e privati*" (DPR n. 203, 24 maggio 1988).

I contaminanti atmosferici possono essere presenti nell'aria allo stato solido, liquido, o gassoso e derivare sia da processi naturali che da attività antropiche. Essi possono essere presenti in quantità tali o con persistenza tale da determinare profonde alterazioni delle normali caratteristiche chimico-fisiche dell'aria.

Le principali fonti naturali di inquinamento sono rappresentate dalle eruzioni vulcaniche, geotermiche, dalle attività microbiche, da incendi e da aerosol marini (Wild & Jones, 1995).

Tali fonti, però, pur emettendo grandi quantità di contaminanti non risultano pericolose per l'ambiente perché sono emissioni limitate e ben distribuite nello spazio.

Tra le attività antropiche che provocano inquinamento atmosferico vi sono la produzione e l'uso di combustibili e carburanti, i processi industriali (in particolare chimici e metallurgici), l'estrazione di minerali, l'incenerimento di rifiuti, l'attività agricola.

Gli inquinanti atmosferici possono essere classificati in primari e secondari.

I primari (Tab. 1.1) sono contaminanti direttamente emessi nell'atmosfera e sono, ad esempio, l'etilene (C_2H_4), il metano (CH_4), il biossido di zolfo (SO_2), gli ossidi di azoto (NO_x), il monossido di carbonio (CO), il benzene (C_6H_6), gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), l'acido fluoridrico (HF), l'ammoniaca (NH_3) e i composti organici volatili (VOC).

Gli inquinanti *secondari* sono sostanze che non vengono emesse dalle sorgenti tal quali ma derivano dalla reazione in atmosfera tra più inquinanti primari tramite catalizzatori

chimico-fisici. Molti inquinanti secondari costituiscono lo “smog fotochimico”: O_3 , PAN (perossiacilnitrato), HNO_3 e H_2SO_4 . Anche gli IPA possono essere soggetti a reazioni e trasformazioni chimico-fisiche in atmosfera e entrare a far parte dello smog fotochimico. Essi pur essendo usualmente emessi nell’atmosfera sotto forma gassosa, tendono rapidamente a condensarsi, caratteristica che facilita l’adsorbimento sulla superficie del **particolato**. Quest’ultimo rappresenta uno degli inquinanti che ha il maggiore impatto nelle aree urbane, ed è costituito dall’insieme delle sostanze sospese in aria (fibre, particelle carboniose, metalli, silice, inquinanti liquidi o solidi) con diametro compreso tra $0,005 \mu m$ e $500 \mu m$. Poiché le particelle molto fini crescono rapidamente per coagulazione tra loro e le particelle più grossolane sedimentano velocemente per effetto della gravità, la maggior parte del particolato è costituito da particelle con dimensioni nel range $0,1-10 \mu m$. Il particolato può essere classificato come inquinante primario e secondario. Il *particolato primario* è emesso da diverse sorgenti come dagli scarichi di autoveicoli, da processi industriali e da sorgenti naturali. Il *particolato secondario* è quello che si forma direttamente nell’atmosfera per interazioni tra gas, gas/vapore, gas/vapore/solido. Gli elementi che concorrono alla formazione di questi aggregati sospesi nell’aria possono essere sia fattori naturali (che si stima superino il 90% del totale) che antropici. Tra i primi vi sono ad esempio: erosione di rocce, eruzioni vulcaniche, incendi, microrganismi, aerosol marino, polvere, terra, pollini e spore. Fra i fattori antropici si includono le emissioni della combustione dei motori a scoppio (autocarri, automobili, aerei), emissioni del riscaldamento domestico (a gasolio, carbone o legna), residui dell’usura del manto stradale, dei freni e delle gomme delle vetture, emissioni di lavorazioni meccaniche, dei cementifici, dei cantieri, lavorazioni agricole, inceneritori e centrali elettriche, fumo di tabacco.

In genere il particolato prodotto da processi di combustione, siano essi di origine naturale o antropica, è caratterizzato dalla presenza preponderante di carbonio e sottoprodotti della combustione, e definito “particolato carbonioso”.

La quantità totale di polveri sospese è in genere misurata in maniera quantitativa (peso/volume). In assenza di inquinanti atmosferici particolari, il pulviscolo contenuto nell’aria raggiunge concentrazioni diverse (g/m^3) nei diversi ambienti:

- 0,05 - 0,10 in zone rurali

- 0,10 - 0,20 in città
- 0,20 - 0,40 in zone industriali.

L'insieme delle polveri totali sospese (PTS), che descrive la frazione di particelle depositate su una superficie, può essere scomposto a seconda della distribuzione delle dimensioni delle particelle identificate in base al loro *diametro aerodinamico medio*.

L'identificativo delle dimensioni che viene utilizzato è il *Particulate Matter*, abbreviato in **PM**, seguito dal diametro massimo delle particelle.

Pertanto, si parla di:

Particolato grossolano: particolato sedimentabile di dimensioni superiori ai 10 µm.

PM₁₀: particolato formato da particelle inferiori a 10 µm. Esso include sia le particelle primarie (emissioni da traffico) che secondarie (nitrato e solfato d'ammonio).

PM_{2,5}: *particolato fine* con diametro inferiore a 2,5 µm.

PM₁: *particolato ultrafine*, ha diametro inferiore ad 1 µm.

Il particolato atmosferico (Fig. 1.1) è costituito da una matrice carboniosa e da composti organici e inorganici ad essa legati. Tra i composti organici vi sono gli IPA e i nitro-IPA. Tra i composti inorganici vi sono metalli in tracce, solfati e nitrati; inoltre possono depositarsi sul particolato anche particelle biologiche come batteri, spore e pollini.

Inquinanti	Principali fonti antropogeniche	Emissioni antropogeniche sul tot (10⁶ ton. per anno)	Tempo medio di permanenza nell'atmosfera
CO	Uso di combustibili fossili, combustione di biomasse	700/2000	mesi
CH ₄	Discariche, produzione di combustibile	300/550	100 anni
NO _x	Uso di combustibili fossili	20/50	giorni
IPA	Combustioni	10/20	mesi
SO ₂	Uso di combustibili fossili, fonderie	100/200	da giorni a settimane

Tabella 1.1. Origini e concentrazioni dei più importanti inquinanti primari presenti in atmosfera.

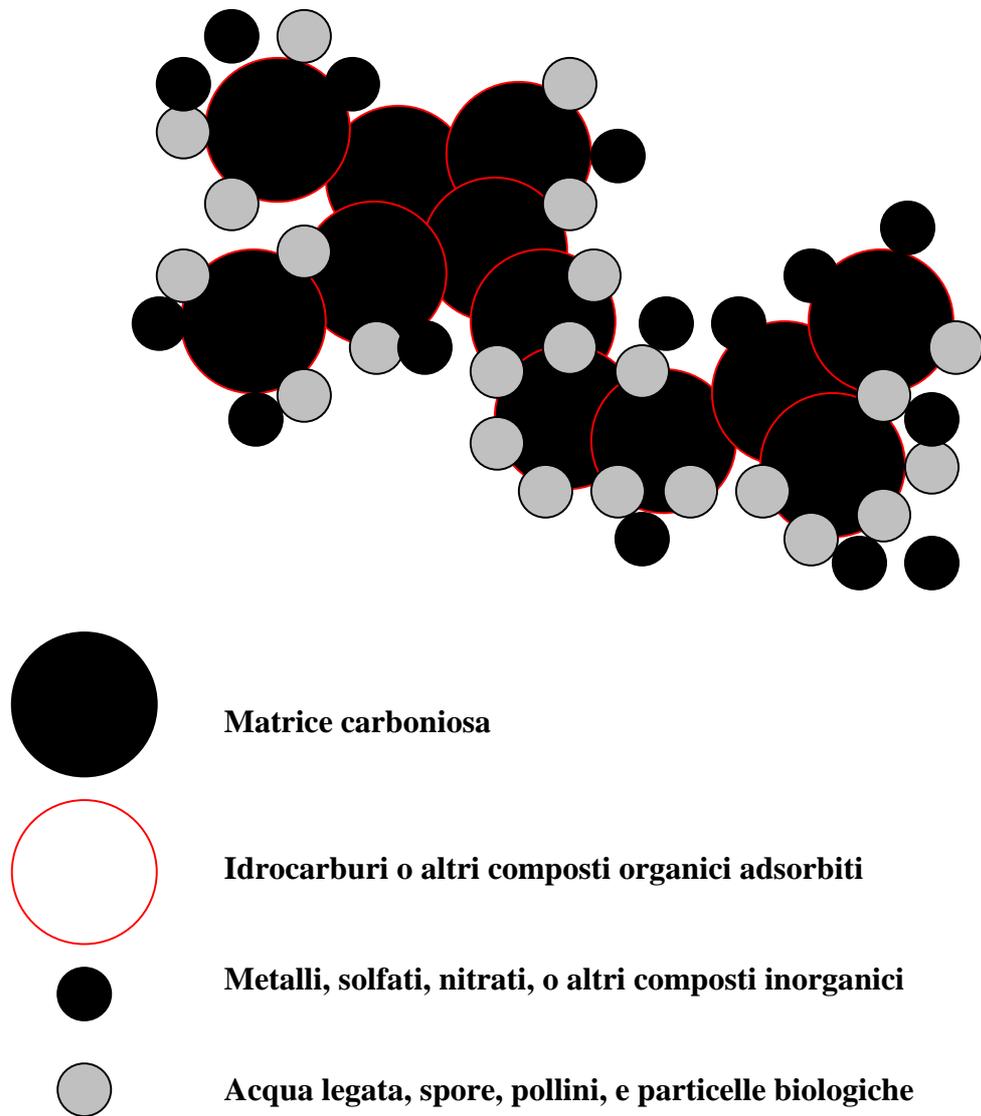


Figura 1.1 Composizione chimica del particolato atmosferico

La permanenza del particolato in atmosfera è funzione del diametro delle particelle; le particelle più fini rimangono sospese per lungo tempo in aria, infatti:

Diametro particella (μm)	Velocità di caduta (cm/sec)
100	30
10	0,3
1	0,003
0,1	0,00009

Al PM_{10} fanno riferimento numerose normative europee quali le Direttive 1999/30/EC e 96/62/EC, con cui la Commissione Europea ha fissato i limiti per la concentrazione delle PM_{10} nell'aria (Tab. 1.2):

	Fase 1 dal 1° gen 2005	Fase 2¹ dal 1° feb 2010
Valore massimo per la media annuale	40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Valore massimo giornaliero (24-ore)	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
N. massimo di superamenti consentiti in un anno	35	7

Tabella 1.2. Limiti per la concentrazione delle PM_{10} nell'aria (European Communities, 1999).

¹ Termine indicativo.

In Italia, il DM 60 del 2 aprile 2002, che accoglie le direttive europee, prevede:

- *Un valore limite di 24 ore per la protezione della salute umana* (la media giornaliera delle concentrazioni di PM_{10} non deve superare il valore di 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per più di 35 volte per anno civile).
- *Un valore limite annuale per la protezione della salute umana* (la media annuale delle concentrazioni di PM_{10} non deve superare il valore di 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

1.1 Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Origine, proprietà, fonti di emissione

Gli IPA si formano in seguito a processi di combustione incompleta di materiali organici. Il meccanismo è alquanto complesso: si ha dapprima una ripolimerizzazione, in carenza di ossigeno, dei frammenti di idrocarburo che si formano durante reazioni di demolizione delle frazioni più altobollenti in frazioni più volatili. Durante questo processo le molecole si spezzano e si riarrangiano in molecole più piccole; inizialmente prevalgono frammenti a due soli atomi di carbonio, che reagiscono con una molecola di acetilene, C_2H_2 : il risultato di tale reazione è un altro radicale a quattro atomi di carbonio (Fig. 1.2 a). Il radicale che si forma in questa reazione può in seguito aggiungere un'altra molecola di acetilene e formare un anello a sei atomi di carbonio (Fig. 1.2 b). A tal punto, l'atomo di idrogeno, legato al carbonio del CH_2 può staccarsi dando origine a una molecola di benzene o aggiungere altre molecole di acetilene dando luogo a catene laterali che formano ulteriori anelli benzenici condensati (Fig. 1.2 c). Le temperature elevate (650-900 °C) e la carenza di ossigeno favoriscono la formazione degli IPA: infatti, generalmente, col diminuire del rapporto ossigeno-combustibile si ha un incremento della velocità della loro formazione.

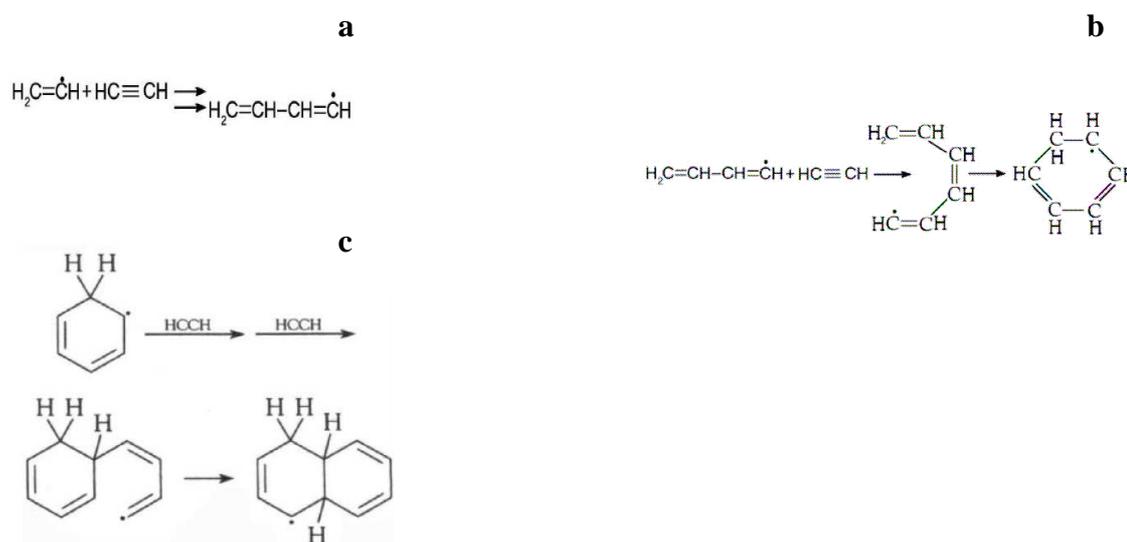


Figura 1.2 Processo di formazione degli IPA.

Gli IPA consistono in due o più anelli aromatici condensati, uniti fra loro tramite una coppia di atomi di carbonio condivisi. La disposizione degli anelli può essere in arrangiamenti lineari, angolari o in cluster (Baek et al., 1991). Teoricamente il numero degli IPA è enorme; per esempio, l'unione di cinque anelli benzenici, nelle varie combinazioni, può dare origine a ventidue composti diversi.

La nomenclatura IUPAC attribuisce un numero progressivo agli atomi di carbonio capaci di legare un sostituente e una lettera minuscola, unita al numero dell'atomo di carbonio immediatamente precedente, a quelli che costituiscono una giunzione tra due anelli. Inoltre si conoscono molti idrocarburi benzo-derivati, nei quali la posizione di fusione è identificata da una lettera in parentesi quadra, che indica su quale lato del sistema genitore è avvenuta la fusione.

La distribuzione degli IPA in atmosfera, in fase vapore o legata al particolato, dipende dalla temperatura dell'aria e dalle caratteristiche chimico-fisiche di ogni IPA. La tensione di vapore di questi composti è bassa ed è inversamente proporzionale al numero di anelli contenuti. Al diminuire della temperatura, gli IPA aventi peso molecolare più elevato (4 anelli o più), caratterizzati da una bassa tensione di vapore, tendono rapidamente a condensare e a venire adsorbiti alla superficie delle particelle aerosospese, mentre quelli a minore peso molecolare (3 anelli), aventi un'alta tensione di vapore, rimangono parzialmente nella fase vapore per poi condensare. Quindi in un campione di aria gli IPA ad elevato peso molecolare si trovano esclusivamente legati al particolato (principalmente con diametro inferiore a 2,5 μm) mentre quelli a basso peso molecolare possono anche trovarsi liberi nell'atmosfera, in forma gassosa.

I composti mediamente volatili a quattro anelli possono trovarsi in entrambe le fasi (Bidleman, 1988; McLachlan, 1996) ma l'associazione alla fase gassosa o solida è soggetta alla variabilità stagionale.

Generalmente le concentrazioni di IPA tendono ad essere circa un ordine di grandezza più alte in inverno rispetto all'estate (Menichini et al., 1999). La principale ragione di queste variazioni sono: fattori meteorologici (come maggiore stabilità atmosferica in inverno); maggiori emissioni dovute al riscaldamento domestico e minore reattività atmosferica degli IPA in inverno (ad esempio ridotti fenomeni di degradazione per foto-ossidazione e reazione con i radicali OH).

Come tutti i composti aromatici anche gli IPA presentano proprietà simil-benzeniche quali stabilità elevata e struttura geometrica piana. Le proprietà chimiche e fisiche dipendono dalle loro dimensioni, ovvero dal numero di atomi di carbonio e dalla struttura elettronica. Gli IPA sono solidi a temperatura ambiente e hanno punti di ebollizione e di fusione elevati.

Le principali **fonti di emissione** degli IPA sono cinque: domestica, mobile, principalmente dovuta a scarichi dei motori a diesel e a benzina (Kiss et al., 2001), stazionaria, soprattutto di tipo industriale, agricola e naturale (Baek et al., 1991). Quest'ultima, rappresentata da emissioni vulcaniche, incendi di biomassa, e biosintesi da parte di piante e microbi (Krauss et al., 2005), risulta insignificante paragonata alle fonti antropogeniche. Gli IPA presenti in atmosfera, sia in fase gassosa sia associati al particolato, vengono anche emessi da vari processi di combustione di materiale organico, quali petrolio, legna e carbone, pirolisi di plastiche, soprattutto polipropilene (Mitera & Michael, 1985; Fardell et al., 1986; Levin, 1987; Wheatley et al., 1993). In misura minore essi vengono inoltre emessi dal fumo delle sigarette e dalla superficie di alimenti affumicati.

Le fonti stazionarie di IPA contribuiscono per circa il 90% alle emissioni totali di tali inquinanti, ma ciò non è vero nelle aree urbane, dove il traffico veicolare è la fonte prevalente (Baek et al., 1991).

Le emissioni domestiche sono dovute principalmente alla combustione di carbone e legna, risultano piuttosto numerose e diffuse e non sono regolamentate uniformemente in Europa. Attualmente gli oli e il gas impiegati per il riscaldamento domestico hanno basse emissioni di IPA e comunque esistono sistemi di abbattimento (come alcuni catalizzatori) che provocano una riduzione delle loro emissioni.

Le fonti mobili sono dovute al traffico aereo, nautico e ferroviario oltre che a quello di veicoli a motore su strada, sebbene i dati disponibili sulle emissioni di IPA da fonti mobili si riferiscano essenzialmente al traffico veicolare.

I veicoli a motore a combustione interna sono solitamente alimentati a benzina o diesel e un minor numero a GPL o a metano. La produzione di IPA è legata principalmente al rapporto aria-carburante e la quantità di IPA prodotta si riduce al diminuire della miscela. L'uso di convertitori catalitici ha effetti significativi sulla riduzione della

concentrazione di IPA nei gas di scarico. Tutti i motori a combustione interna hanno diverse caratteristiche di emissione degli IPA che dipendono dalla temperatura del motore, carico, qualità del carburante e velocità (European Commission, 2001).

Le aree urbane con condizioni di elevato traffico veicolare sono caratterizzate da una forte incidenza di IPA che aumenta con il chilometraggio e il deterioramento del motore. Diversi studi hanno dimostrato che l'impiego di convertitori catalitici provoca una diminuzione di emissione di IPA tra l'80-90% (94% per il BaP) nel caso di motori a benzina, minore per quelli a gasolio (CONCAWE, 1998). Una fonte addizionale di IPA nei veicoli alimentati a benzina e a diesel, sono gli IPA nel carburante (Westerholm et al., 1988; Westerholm & Li, 1994); di conseguenza, si può ottenere una riduzione nelle emissioni di IPA nei gas di scarico abbassando il contenuto di IPA nel comburente.

I veicoli alimentati con diesel hanno emissioni di particolato più alte rispetto ai veicoli alimentati a benzina. Le particelle consistono in fuliggine generata dalla combustione, una frazione minerale e una frazione idrocarburica (dove sono presenti gli IPA) estraibile in solventi. Per rispettare i limiti imposti dalle nuove normative europee (EURO 4), sono in via di perfezionamento degli accorgimenti tecnologici per ridurre le emissioni legate al particolato, come, ad esempio, filtri che intrappolano le polveri.

1.2 Tossicità degli IPA

Gli IPA vengono studiati con attenzione per un duplice motivo: per il ruolo che giocano come precursori dell'O₃ fotochimico, responsabile di alterazioni delle funzioni polmonari, e per la riscontrata tossicità di alcuni di essi, definiti cancerogeni. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) classifica tra gli agenti "probabilmente cancerogeni per l'uomo" il Benzo[a]antracene, il Dibenzo[a,h]antracene e il Benzo[a]pirene, che sperimentalmente sono cancerogeni per gli animali. Altri IPA sono classificati come "possibilmente cancerogeni per l'uomo" (IARC, 1987). Fino ad ora la IARC ha classificato 48 IPA in funzione della loro capacità di fungere da induttori tumorali. In Tabella 1.3 è riportata la classificazione IARC dei principali IPA e la loro cancerogenità.

Gli effetti negativi diretti degli IPA sulla salute umana sono ben documentati, soprattutto per ciò che riguarda la carcinogenesi dovuta agli IPA associati al particolato (Lyll et al., 1988; Nauss, 1995). L'effetto cancerogeno degli IPA è correlato ad una struttura con un numero di anelli aromatici superiore a tre, che, a seguito di processi di biotrasformazione, dà origine a "dioloepossidi", composti instabili che possono essere idrolizzati a tetrololi in grado di legarsi al DNA, all'albumina e all'emoglobina.

Gli IPA accumulati nella vegetazione o in diversi organismi, come ad esempio specie marine, possono causare indirettamente gravi danni alla salute umana attraverso il consumo di cibi contaminati (Wang & Wang, 2006). Proprio per l'estrema pericolosità di tali inquinanti, il loro monitoraggio è considerato essenziale (European Communities, 1996).

Composto IPA	Numero di anelli	Grado di cancerogenità IARC ¹	
		Animale	Uomo
Antracene	3	I	3
Fenantrene	3	I	3
Benzo[c]fenantrene	4	I	3
Crisene	4	L	3
Benzo[a]antracene	4	S	2A
Pirene	4	I	3
Trifenilene	4	I	3
Benzo[b]fluorantene	5	S	2B
Benzo[j]fluorantene	5	S	2B
Benzo[k]fluorantene	5	S	2B
Benzo[a]pirene	5	S	2A
Benzo[e]pirene	5	I	3
Dibenzo[a,c]antracene	5	L	3
Dibenzo[a,h]antracene	5	S	2A
Dibenzo[a,j]antracene	5	L	3
Perilene	5	I	3
Antantrene	6	L	3
Benzo[g,h,i]perilene	6	I	3
Indeno[1,2,3-cd]pirene	6	S	2B
Coronene	6	I	3
Dibenzo[a,e]pirene	6	S	2B
Dibenzo[a,h]pirene	6	S	2B
Dibenzo[a,i]pirene	6	S	2B
Dibenzo[a,l]pirene	6	S	2B

Tabella 1.3. Classificazione dei principali IPA e la loro cancerogenità.

¹ I: evidenza inadeguata; L: evidenza limitata; S: evidenza sufficiente; 2A: probabile cancerogeno per l'uomo; 2B: possibile cancerogeno per l'uomo; 3: non classificabile come cancerogeno per l'uomo.

1.3 Normativa sugli IPA in Europa

Nel 1999, la Commissione Europea ha appositamente creato un gruppo di lavoro per riconsiderare tutte le implicazioni relative agli IPA, sulla scia della Direttiva Quadro 96/62/EC, indicando le strategie di valutazione e raccomandandone il monitoraggio. Il lavoro di tale gruppo era focalizzato sull'esaminare le fonti di emissione note di IPA, le informazioni relative alle concentrazioni di tali composti in atmosfera, le tecniche per la loro misura e gli effetti provocati da tali inquinanti.

Attualmente non ci sono direttive europee che regolino le emissioni degli IPA o definiscano gli obiettivi di qualità dell'aria relativamente a questi inquinanti. In base a quanto stabilito in un Protocollo sui "POPs" (inquinanti organici persistenti) sottoscritto dalla Commissione Europea, le emissioni di alcuni specifici IPA devono essere trasmesse in un rapporto annuale dagli stati membri dell'UE; inoltre, è stato stabilito che le emissioni di IPA nel 2010 non dovranno eccedere i livelli del 1990.

Tutti gli stati membri dell'UE hanno impiegato il Benzo[a]pirene come indicatore di esposizione all'intera classe degli IPA in ragione della forte correlazione tra il BaP e gli altri IPA cancerogeni in diverse condizioni di emissione (Fertmann et al., 1999).

Generalmente è stato fissato un valore limite per il BaP non superiore a 1 ng/m^3 di aria, e un valore guida intorno a $0,1-0,5 \text{ ng/m}^3$ di aria. Come valore "obiettivo di qualità" la concentrazione di BaP è invece fissata solitamente al di sotto di $0,02 \text{ ng/m}^3$ di aria, sebbene le linee guida tese a ridurre la concentrazione di IPA in atmosfera variano a seconda dello stato membro.

La Svezia ha fissato un valore limite anche per il fluorantene. Questo perché da alcuni studi (Boström et al., 1999), è emerso che tale composto è mutagenico, sebbene non classificato come tale dalla IARC, e risulta presente in concentrazioni piuttosto elevate in atmosfera. Inoltre, è stato rilevato che le emissioni da impianti domestici e di riscaldamento contengono 50 volte più fluorantene che BaP.

Pur non essendoci un controllo diretto sugli IPA esistono tuttavia una serie di direttive che definiscono i livelli di emissione di tali inquinanti o la loro concentrazione in aria. Tali direttive includono il Programma sugli Oli delle auto, l'incenerimento dei rifiuti, la direttiva IPPC (96/61/EC), la Direttiva Quadro (96/62/EC) e la sua successiva

(1999/30/EC) con riguardo al particolato. Inoltre, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato nel 1987 e nel 2001 dei documenti che definiscono le linee guida per la qualità dell'aria. Si stima che gli effetti di questa politica di abbattimento degli IPA verranno apprezzati tra lungo tempo, sebbene entro 10-20 anni le emissioni di IPA dai veicoli stradali risulteranno notevolmente ridotte in seguito all'applicazione della normativa EURO 4 (Fraunhofer ITA FoBiG ifeu, 1999).

1.4 Gli IPA in atmosfera

La composizione chimica degli IPA in atmosfera può variare in seguito a processi di ri-sospensione e ri-volatilizzazione, e degradazione fisica e chimica sia in fase gassosa che nel particolato (Coleman et al., 1999). La velocità e i meccanismi di rimozione chimica degli IPA dall'aria sono influenzati dalla loro associazione alla fase gassosa o solida.

La reattività chimica di questi composti è influenzata da molti fattori ambientali fra i quali la temperatura, la luce, i livelli di ossigeno e di ozono, la presenza di co-inquinanti e di materiale capace di adsorbirli. È stato osservato che la reattività degli IPA puri è maggiore rispetto a quella riscontrata negli idrocarburi adsorbiti su fuliggine: ciò suggerisce che l'adsorbimento su materiale particolato funga da protezione nei riguardi della foto-ossidazione. L'ossidazione fotochimica è uno fra i più importanti processi di degradazione degli IPA. Gli IPA possono subire anche ossidazioni chimiche reagendo con i radicali liberi e con l'ozono, reazioni non influenzate dalla luce.

Alcuni IPA si ossidano rapidamente al buio solo se sono adsorbiti su particelle contenenti radicali liberi. Gli IPA possono reagire con NO_2 , SO_2 e SO_3 se sono esposti alla luce e in presenza di acido solforico e nitrico.

Gli IPA adsorbiti su polveri bianche e scure hanno un tempo di vita diverso. Infatti il tempo di vita di questi inquinanti aumenta quanto più scuro è il colore delle polveri a cui essi sono adsorbiti in quanto i substrati scuri assorbono la luce e inibiscono il processo di fotolisi.

Spesso in estate gli IPA legati al particolato vengono incorporati nel “bulk” di aerosol risultando così maggiormente protetti da fotolisi e reazioni termiche.

I radicali OH sono più abbondanti in estate che in inverno e possono essere presenti in concentrazioni significative durante il giorno. La resistenza di IPA a 2 e 4 anelli prima di reagire con gli OH risulta tra 2 e 12 ore in estate e tra 10 ore e 2,7 giorni in inverno.

Durante il giorno NO₃ è presente in basse concentrazioni mentre di notte risulta presente in concentrazioni maggiori. La rimozione degli IPA per reazione con NO₃ è spesso insignificante (European Commission, 2001).

La maggior parte degli IPA in fase gassosa risulta resistente alla reazione con O₃ (Tab. 1.4).

IPA	Tempo di vita relativamente alla reazione con:			
	OH		NO ₃	O ₃
	<i>Estate</i>	<i>Inverno</i>		
Naftalene	12 h	2,7 g	6,0 a	> 80 g
Acenaftene	3,5 h	18 h	4,8 h	>30 g
Acenaftilene	2,6 h	13 h	24 min	43 min
Fluorene	1,8 g	9 g	n.d. ¹	n.d.
Fenantrene	9,0 h	1,9 g	n.d.	n.d.
Antracene	2,1 h	10 h	n.d.	n.d.
Fluorantene	5,6 h	1,2 g	340 g	n.d.
Pirene	5,6 h	1,2 g	120 g	n.d.

Tabella 1.4. Tempi di vita di alcuni IPA a 2 e 4 anelli relativamente alla reazione con radicali OH, nitrati (NO₃) e radicali ozono (O₃).

¹n.d.: non determinata.

I tempi di vita degli IPA relativamente alla rimozione per deposizione sono solitamente più lunghi dei tempi di vita chimici, almeno per le specie in fase gassosa (Tab. 1.5). La velocità della deposizione secca di specie in fase gassosa dipende dal tipo di superficie di deposizione: ad esempio sulle foreste decidue è particolarmente efficiente (European Commission, 2001).

IPA	Foresta decidua		Foresta di conifere	
	Velocità di deposizione (cm s ⁻¹)	Tempo di vita	Velocità di deposizione (cm s ⁻¹)	Tempo di vita
<i>Fase gassosa</i>				
Fenantrene	0,37	1,6 g	0,035	17 g
Fluorantene	1,9	7,3 h	0,15	3,9 g
Pirene	2,4	5,8 h	0,16	3,6 g
<i>Fase particolata</i>				
Benzo[e]pirene	0,78	18 h	0,051	11 g
Benzo[a]pirene	0,88	16 h	0,061	9,5 g
Dibenzo[a,h]antracene	0,73	19 h	0,055	11 g
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0,60	23 h	0,038	15 g
Benzo[g,h,i]perilene	0,74	19 h	0,047	12 g
Coronene	0,65	21 h	0,048	12 g

Tabella 1.5. Velocità di deposizione sulla superficie vegetale di alcuni IPA in fase gassosa e legati al particolato, e tempo di vita relativamente alla rimozione per deposizione. (European Commission, 2001).

Gli IPA rischiano di contaminare in modo irreparabile tutte le matrici ambientali: infatti, in seguito alla fuoriuscita del petrolio dalle navi-cisterna, dalle raffinerie e dai punti di trivellazione, si sono rinvenute tracce di questi inquinanti nel suolo e nelle acque (mari, fiumi, falde acquifere) oltre che nell'aria. A causa dell'alta lipofilità, gli IPA tendono ad associarsi con le sostanze particellari o con le sostanze oleose presenti nei sistemi acquatici e terrestri. Nel suolo tali inquinanti tendono ad aggregarsi con la sostanza organica (Richnow et al., 1997; Howsam et al., 2001), in particolare gli IPA con più di quattro anelli sono sempre legati alle sostanze particellari, mentre quelli a basso peso molecolare (due o tre anelli) sono più solubili e si trovano, pertanto, liberi nella fase acquosa. La velocità di degradazione degli IPA nel suolo è generalmente più bassa che in aria. A causa della loro lipofilità gli IPA vanno incontro a fenomeni di accumulo nelle foglie di diverse specie di piante così come nei tessuti adiposi di alcuni organismi.

2. Il biomonitoraggio

Nel biomonitoraggio, ovvero il monitoraggio dell'inquinamento attraverso gli organismi viventi, effettuato principalmente mediante organismi vegetali, si possono impiegare diversi livelli di organizzazione: dal singolo organismo (o parte di esso), alla comunità. A livello di organismo, gli effetti dell'inquinamento possono essere espressi in termini di **bioaccumulo** ovvero accumulo di inquinanti nei tessuti senza sintomi di danno nell'organismo, o in termini di **bioindicazione** ovvero attraverso l'osservazione di un visibile specifico danno morfologico e/o fisiologico (Posthumus, 1984). Poiché la deposizione degli inquinanti e il loro accumulo nei tessuti degli organismi è funzione della loro concentrazione nell'aria, si possono sottoporre ad analisi chimica i tessuti vegetali per verificare la presenza di certi inquinanti e misurarne le concentrazioni al fine di valutare gradienti di contaminazione dell'aria.

Le caratteristiche essenziali per un bioaccumulatore sono:

- la possibilità di definirne l'età;
- l'alta tolleranza per la sostanza in esame;
- la capacità di accumulo fino ad alte concentrazioni.

Il monitoraggio mediante l'impiego degli organismi viventi permette di disporre di un metodo economico per l'analisi dell'inquinamento e fornisce dati integrati nel tempo, diversamente dalle strumentazioni di rilevamento chimico-fisico che forniscono dati puntiformi.

Negli ultimi decenni diversi studi hanno evidenziato la possibilità di utilizzare organismi vegetali come bioaccumulatori nel monitoraggio dell'inquinamento atmosferico da metalli pesanti (Bargagli et al., 1997; Monaci et al., 1997; Bargagli et al., 1998) e da IPA (Alfani et al., 2001, 2005; De Nicola et al., 2005). Il livello di inquinamento può essere monitorato misurando la concentrazione degli inquinanti in campioni non lavati o comunque non trattati con solventi (Lehndorff & Schwark, 2004). La capacità di accumulare inquinanti organici persistenti (POPs) tra cui IPA, risiede nell'alta percentuale lipidica nei tessuti che permette l'accumulo di tali inquinanti

lipofili. Alcuni autori hanno dimostrato come muschi epifitici (*Hypnum cupressiforme*) e aghi di conifere (*Pinus sylvestris*) siano particolarmente indicati per il monitoraggio di tali composti, in particolar modo per evidenziare differenze di distribuzione spaziale su scala locale e regionale. I muschi infatti, non essendo dotati di un apparato radicale, ricevono l'apporto di tali sostanze inquinanti esclusivamente dall'atmosfera (come per i nutrienti), mentre la superficie cerosa degli aghi di pino funge da "trappola" per gli inquinanti gassosi atmosferici (Holoubek et al., 2000). I muschi, inoltre, non presentano "sistemi" in grado di regolare il bioaccumulo, diversamente dalle piante superiori, ragione per cui i loro tessuti raggiungono concentrazioni di inquinanti molto alte che riflettono la contaminazione atmosferica (Aboal et al., 2004).

Gerdol et al. (2002) hanno impiegato muschi della specie *Tortula muralis* per monitorare la contaminazione atmosferica di IPA e metalli in traccia. L'analisi ha permesso di evidenziare le differenze spaziali di contaminazione da IPA e da metalli tra siti rurali, urbani e industriali in Italia Settentrionale, rilevando una maggiore concentrazione di ambedue le categorie di inquinanti nei siti a maggiore impatto antropico.

Le specie arboree maggiormente impiegate come biomonitori sono *Pinus sylvestris*, *Picea abies* e *Quercus ilex*, comuni in Europa settentrionale e meridionale, mentre in altre aree come ad esempio nel Nord-Ovest della Spagna, le specie più comuni sono *Quercus robur* e *Pinus pinaster* che risultano pertanto le specie più utilizzate in studi di biomonitoraggio in queste zone (Aboal et al., 2004).

2.1 Accumulo degli IPA nelle foglie

La vegetazione agisce come un “sink” di IPA, sottraendone una rilevante percentuale all’atmosfera (Wagrowski & Hites, 1997), come suggerisce la figura 2.1, che indica il modello del trasporto e della deposizione di IPA (Lehndorff & Schwark, 2004).

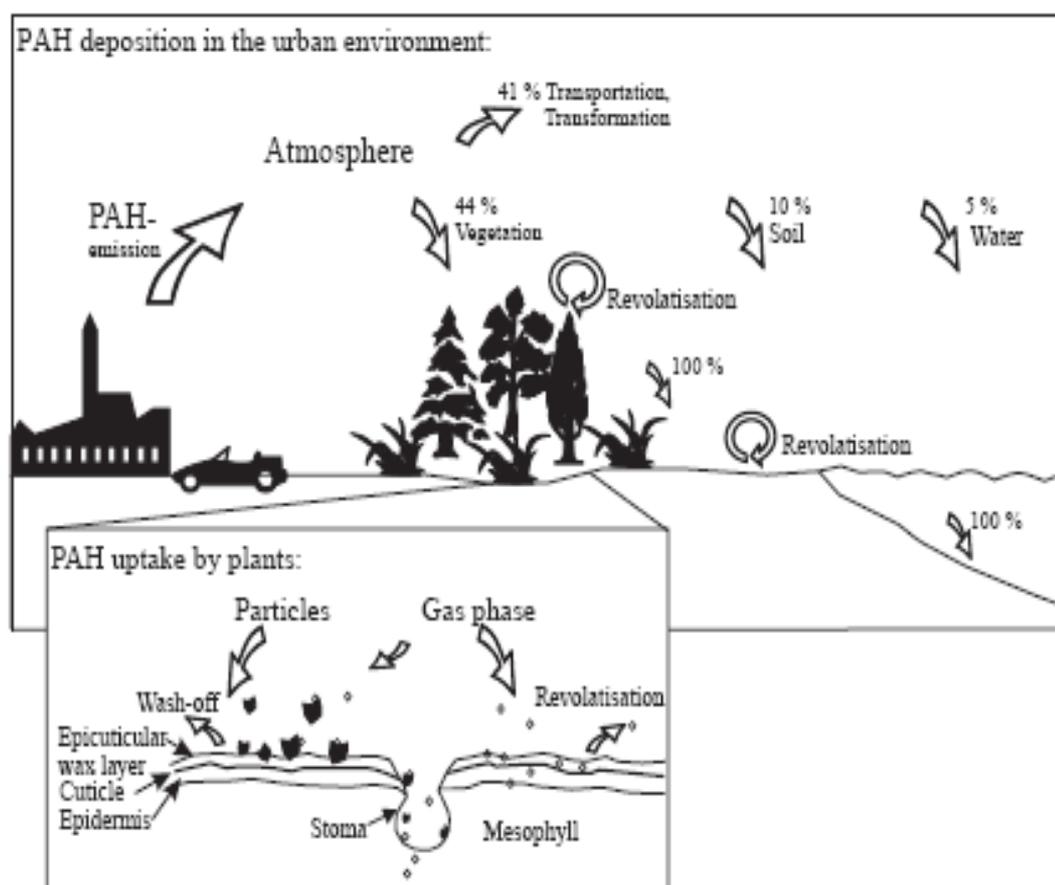


Figura 2.1 Modello del trasporto e deposizione di IPA: la vegetazione agisce come “sink” ovvero deposito di inquinanti organici lipofili. La figura illustra le modalità di accumulo di IPA evidenziando le differenze nell’assorbimento di inquinanti gassosi e legati al particolato (Lehndorff & Schwark, 2004).

L’assorbimento di IPA può avvenire sia in seguito a deposizione atmosferica sulle parti aeree delle piante che dal suolo attraverso il flusso xilematico: questa seconda “via” è però meno importante, a causa dell’alta lipofilità e della scarsa idrofilicità degli IPA

che presentano un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua solitamente superiore a 10^4 , il che si traduce in una bassa tendenza al trasferimento di tali sostanze nello xilema (Simonich & Hites, 1995). Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{oa}) è un parametro di fondamentale importanza per comprendere l'assorbimento di composti organici. Esso rappresenta una misura della lipofilità di questi inquinanti ed esprime la capacità di accumulo dei composti in fasi apolari, quali ad esempio i lipidi delle piante:

$$K_{oa} = [S_{\text{ottanolo}}]/[S_{\text{acqua}}]$$

Le sostanze presenti in atmosfera nella fase vapore possono penetrare direttamente nelle foglie attraverso gli stomi o possono diffondere attraverso un rivestimento extracellulare, continuo, detto cuticola il cui ruolo principale è la protezione contro la disidratazione (Salisbury & Ross, 1992) e la regolazione dell'assorbimento di tutte le sostanze che non possono entrare per diffusione attraverso la fase gassosa. La cuticola delle piante è costituita da cutina, un polimero insolubile, e da lipidi simili a cere che sono depositati all'interno dello strato cuticolare e all'interfaccia cuticola/atmosfera (Poborski, 1988; Riederer, 1989).

Come documentato per gli aghi di pino (Kylin et al., 1994), la superficie cerosa delle foglie e di altri organi come frutti e rami intrappolano il particolato e intercettano i contaminanti in fase vapore: Poborski (1988), suggerì che il naftalene può permeare la cuticola 300 volte più velocemente dell'acqua. La cuticola può anche agire come compartimento di accumulo per composti organici persistenti come gli IPA (Khun et al., 1998; Franzaring & van der Erden, 2000).

Lo spessore, la composizione e le proprietà di assorbimento della cuticola, dipendono, oltre che dalla specie, anche dall'età, dalla stagione, dalla temperatura ambientale, e dalle condizioni della pianta.

Simonich e Hites (1994b), hanno misurato le concentrazioni di 10 IPA nelle foglie, nella corteccia e nei semi dell'acero e del pino bianco. I tessuti delle piante si sono rivelati differenti per il contenuto in lipidi: il valore più alto è risultato nella corteccia di pino con circa 170 mg/g p.s., seguito dalla corteccia d'acero (33 mg/g p.s.), aghi di pino (23 mg/g p.s.), foglie d'acero (16 mg/g p.s.), e semi d'acero (6 mg/g p.s.). Gli autori hanno suggerito che le differenze osservate nella concentrazione degli IPA tra i diversi

tessuti poteva essere spiegata proprio per le differenze nel contenuto lipidico. Tessuti contenenti una maggiore quantità in lipidi accumulavano quantità significativamente più alte di IPA quando venivano esposte alla stessa concentrazione atmosferica degli inquinanti.

Le concentrazioni di IPA ad alto peso molecolare sono risultate maggiori in specie ad accrescimento veloce, mentre non è stata riscontrata alcuna relazione tra il tasso di crescita delle piante e le concentrazioni di IPA semi-volatili a 4 anelli. I composti xenobiotici ad alto peso molecolare sono principalmente associati con le particelle di diametro $< 2 \mu\text{m}$ che tendono a penetrare attraverso gli stomi: ciò fa sì che le specie ad alto tasso di crescita assorbano, durante gli scambi gassosi, quantità di composti maggiori rispetto alle specie a lento accrescimento (Franzaring & van der Erden, 2000). Diversi autori (Kipopoulou et al., 1999; Liu & Korenaga, 2001), hanno riportato risultati che avvalorano la tesi di una maggiore presenza di IPA a basso peso molecolare rispetto a quelli più pesanti in foglie di diverse specie in seguito a deposizioni secche ed umide (Howsam et al., 2000; Barber et al., 2004). Gli IPA a basso peso molecolare presenti nella fase gassosa dell'atmosfera, possono facilmente penetrare attraverso lo strato cuticolare della superficie fogliare e raggiungere i tessuti più interni della foglia (Kuhn et al., 1998) mentre gli IPA a più alto peso molecolare, associati al particolato atmosferico, vengono depositati sulla superficie fogliare per poi essere più facilmente dilavati dalle piogge o allontanati dal vento (Edwards, 1983; Horstmann & McLachlan, 1998).

Khun et al. (1998), hanno dimostrato l'esistenza di due diversi *sink* di IPA nelle foglie di pioppo. Tali autori hanno misurato la distribuzione di 13 IPA tra la cuticola e le rimanenti parti della foglia. Lo studio ha rivelato che la maggior parte degli IPA rimane legato alla superficie fogliare mentre solo gli IPA con peso molecolare relativamente basso assorbiti nel compartimento più esterno possono penetrare negli strati più interni della foglia. I composti a 5 e 6 anelli non venivano rinvenuti nel parenchima durante i 5 mesi di sperimentazione, suggerendo che la cuticola agisce come un compartimento di accumulo sia per gli IPA volatili che per quelli non volatili. Dunque gli IPA volatili trovati nei comparti più interni della foglia probabilmente avevano attraversato gli stomi. L'accumulo di inquinanti organici atmosferici nelle piante è influenzato non solo

dalla quantità, ma anche dalla struttura dei lipidi nei tessuti delle foglie (Kömp & McLachlan, 1997) e dalla forma e natura chimica delle cere: le cere con una struttura ben definita possono incorporare maggiormente le polveri rispetto a quelle erose e amorfe. Nonostante queste importanti considerazioni, alcuni studiosi (Böhme et al., 1999; Howsam et al., 2000) hanno comunque rilevato una scarsa correlazione del contenuto lipidico estraibile e del volume cuticolare con il potenziale di accumulo dei composti volatili, mentre altri autori hanno riscontrato correlazioni significative tra contenuto lipidico e accumulo di IPA solo in stadi “maturi” dello sviluppo delle piante (Tao et al., 2006). Una recente ricerca sui meccanismi di assorbimento e accumulo degli IPA nelle foglie (Wild et al., 2004) ha messo in evidenza la possibilità che tali composti possano essere metabolizzati e degradati dalla vegetazione e non solo accumulati nel *bulk* lipidico. Nello studio suddetto, con l’uso di una tecnica non invasiva che impiega un particolare tipo di osservazione microscopica (metodologia TPEM) accoppiata alla fluorescenza, gli autori per 96 ore hanno seguito in foglie di *Zea mays* il “percorso” dell’antracene, scelto in quanto idrocarburo che presenta le caratteristiche chimico-fisiche tipiche della maggior parte degli IPA. I risultati hanno dimostrato che l’antracene si muove dalle cere epicuticolari, attraverso la cuticola e la parete delle cellule epidermiche, per raggiungere infine il citoplasma delle cellule epidermiche, dove viene rinvenuto in quantità pari a circa il 10% della dose inizialmente applicata (Fig. 2.2).

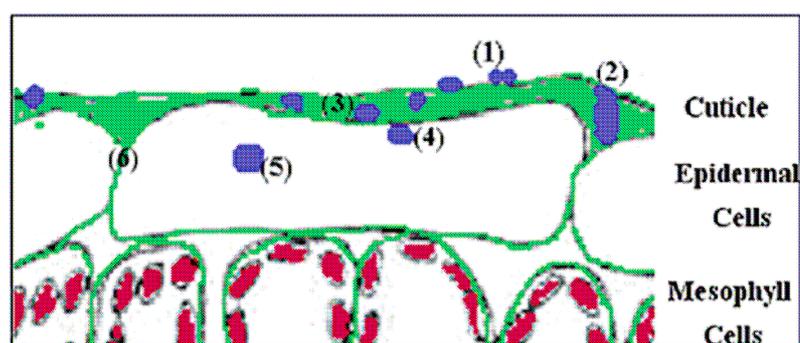


Figura 2.2 Schema che indica le diverse aree della foglia in cui si “muove” l’antracene: 1) all’interno delle cere epicuticolari; 2) come banda che si estende dalle cere epicuticolari alla cuticola; 3) sulla superficie esterna della parete delle cellule epidermiche; 4) sulla superficie interna della parete delle cellule epidermiche; 5) nel citoplasma delle cellule epidermiche e 6) lungo il rivestimento cuticolare. (Wild et al., 2004).

Successivamente, la ricerca è stata approfondita (Wild et al., 2006) mettendo a confronto per 12 giorni il percorso di un altro composto, il fenantrene, idrocarburo maggiormente presente in atmosfera e più adatto alla tecnica impiegata, nelle foglie di due specie diverse (*Zea mays* e *Spinacia oleracia*) esposte ad alti livelli di fenantrene in una camera di fumigazione.

Durante il periodo di sperimentazione, il fenantrene è stato osservato in diverse aree: sulla superficie fogliare adsorbito al particolato ivi depositato, nella cuticola, in prossimità degli stomi e in altri compartimenti a seconda della specie, quali la parete delle cellule epidermiche, nel mesofillo e nello xilema nel mais e nel citoplasma e poi nel vacuolo negli spinaci. Ciò indica che gli IPA non restano legati solo alla matrice lipidica delle foglie, nella fattispecie la cuticola, bensì anche altri compartimenti rappresentano un'importante *sink* di accumulo per tali composti. Inoltre i risultati ottenuti da questi autori hanno supportato ulteriormente il modello a doppio compartimento delle foglie per l'assorbimento di composti organici semivolatili, con una superficie che interagisce direttamente con l'atmosfera e un deposito interno di accumulo più ampio: la cuticola rappresenta, infatti, un compartimento superficiale in cui i composti inizialmente si distribuiscono per poi venire assorbiti a più lungo termine nell'epidermide e nel mesofillo.

Inoltre il "trasferimento" dei composti organici persistenti risulta diverso a seconda della specie: nel caso del mais il fenantrene si muove più velocemente in quanto attraversa le pareti cellulari e gli spazi intercellulari (apoplasto), che non rappresentano un volume significativo della foglia. Negli spinaci, invece, il trasporto del fenantrene è più lento in quanto avviene attraverso il citoplasma cellulare e i vacuoli (simplasto), che rappresentano un volume più ampio della foglia (Fig. 2.3).

b

c

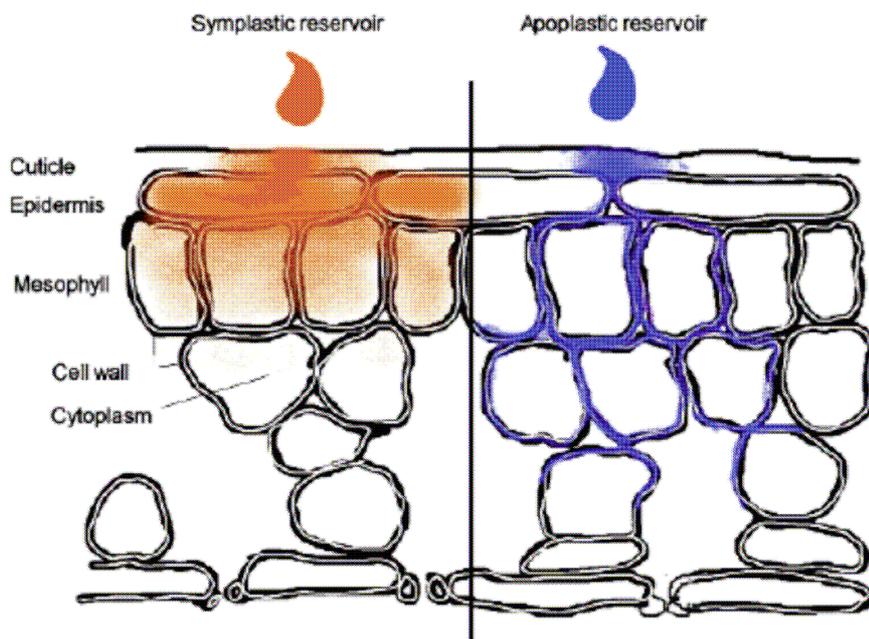


Figura 2.3 Schema del trasporto del fenantrene: simplastico negli spinaci (b) e apoplastico nel mais (c). (Wild et al., 2006).

Anche l'età della foglia può influenzare la struttura e la chimica delle cere epicuticolari, e dunque l'accumulo degli inquinanti atmosferici (Prügel et al., 1994; Jetter et al., 1996).

In studi condotti in Germania sulla specie *Pinus nigra*, l'accumulo di IPA negli aghi di pino risulta maggiore quanto più avanzata è l'età delle foglie (Lehndorff & Schwark, 2004) e aumenta soprattutto nella stagione fredda a causa di fenomeni di condensazione causati dalle basse temperature (Simonich & Hites, 1994, 1995; Franzaring & van der Erden, 2000). Nelle foglie più vecchie diversamente da quelle giovani, l'aumento di IPA è meno rilevante nel tempo, in quanto i compartimenti più interni della foglia hanno già raggiunto la saturazione da IPA nella precedente stagione (Lehndorff & Schwark, 2004).

Il contenuto di IPA nelle foglie dipende tra l'altro anche da fenomeni di fotodegradazione.

Gli IPA legati ai compartimenti superficiali (ad esempio le cere epicuticolari e la cuticola), risultano più suscettibili alla fotodegradazione e alla volatilizzazione, mentre possono essere più facilmente metabolizzati dalla vegetazione se raggiungono il

citoplasma delle cellule epidermiche (Wild et al., 2005). Quando l'antracene, il fluorantrene e il fluorantene vengono aggiunti a foglie di *Zea mays* e poi irradiati con raggi UV-A, l'osservazione diretta mette in evidenza una diversa velocità di fotodegradazione per questi composti (antracene > fluorantene > fenantrene) in differenti compartimenti (maggiore sulla superficie delle foglie rispetto alle cellule epidermiche), (Fig. 2.4).

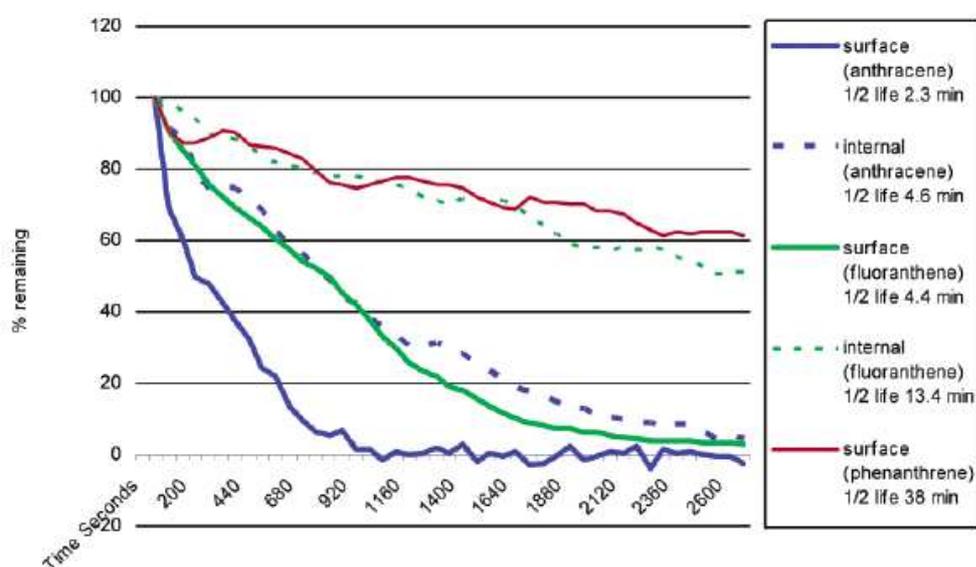


Figura 2.4 Fotodegradazione degli IPA (antracene, fluorantene e fenantrene) sulla superficie e nei tessuti interni di foglie di *Zea mays*. (Wild et al., 2005).

2.2 Ciclo degli IPA in natura

Le ricerche relative all'evoluzione degli IPA durante il processo di senescenza, caduta delle foglie e decomposizione della lettiera risultano piuttosto scarse.

In un'indagine di alcuni anni fa (Howsam et al., 2001), è stato stimato il flusso di sette IPA (benzo(g,h,i)perilene, fluorantene, pirene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, fluorene e fenantrene) in diversi comparti del sistema forestale: i livelli di IPA sono stati quantificati in atmosfera, nelle foglie di alberi di tre specie decidue, nella lettiera di foglie e nel suolo. I risultati hanno dimostrato che i flussi di IPA associati alla lettiera

dopo il periodo estivo erano piuttosto bassi e rappresentavano solo una piccola frazione della quantità depositata nello strato di lettiera: ciò perché in estate le foglie non accumulano alti livelli di IPA in ragione di un minore rilascio di tali inquinanti in atmosfera rispetto all'inverno a causa di fenomeni di combustione più limitati.

Il fluorene e il fenantrene, IPA a basso peso molecolare, hanno nel suolo forestale tempi di residenza più brevi rispetto al fluorantene, al pirene, al benzo(k)fluorantene e al benzo(a)pirene, mentre il benzo(g,h,i)perilene ha un tempo di permanenza molto più lungo. Pertanto, fluorene e fenantrene, proprio perché più volatili, idrosolubili e biodegradabili, non vengono accumulati, mentre gli IPA più pesanti permangono a lungo nel suolo. Il prevalere del processo di “deposito” o di “perdita” di IPA dipende dunque essenzialmente dalle caratteristiche chimico-fisiche dei composti: gli IPA più leggeri (< 180 u.m.a) vengono più velocemente degradati rispetto a quelli più pesanti (circa 200-250 u.m.a.). La degradazione degli IPA durante la decomposizione della lettiera è uno dei processi chiave che regolano il destino di tali inquinanti che vengono apportati al sistema forestale per deposizione atmosferica. I tempi di permanenza degli IPA nel suolo risultano più brevi del turnover del carbonio, eccetto per il benzo(g,h,i)perilene che permane molto più a lungo.

La comunità dei decompositori è capace dunque di degradare e assimilare, parzialmente o totalmente, la maggior parte degli input annuali al sistema forestale di IPA a 3, 4 e 5 anni (Howsam et al., 2001).

Tra gli organismi che sembrano avere il maggiore potere degradativo nei confronti degli IPA, i funghi del marciume bianco (*Phanerochaete chrysosporium*) sono quelli più indagati (Sutherland, 1992; Morgan et al., 1993; Paszczynski & Crawford, 1995) mentre gli studi sui funghi filamentosi sono alquanto scarsi. I funghi del marciume bianco producono enzimi extracellulari, tra cui perossidasi degradanti la lignina e manganese perossidasi che si pensa siano coinvolti nei processi di degradazione degli IPA (Augustin & Muncnerova, 1994). Altre ricerche hanno posto invece l'attenzione su funghi non lignolitici, come *Cunninghamella elegans* (Cerniglia, 1993) e *Penicillium janthinellum* (Launen et al., 1995) che possono metabolizzare una grande varietà di IPA.

3. La decomposizione

3.1 Le fasi e gli organismi coinvolti

La decomposizione è un processo attraverso il quale la necromassa di piante, animali e del biota del terreno viene mineralizzata da funghi e batteri fino ad ottenere composti inorganici, nutrienti, CO₂ e acqua, che risultano così di nuovo disponibili per i produttori; inoltre vengono a formarsi composti organici complessi “recalcitranti” (humus), ovvero resistenti ad un’ulteriore immediata trasformazione microbica. A grandi linee la decomposizione è costituita da tre fasi principali:

- 1) *Lisciviazione* di composti solubili in acqua che si allontanano dalla sostanza organica raggiungendo la matrice del suolo. Tali composti possono essere assorbiti dagli organismi, reagire con la fase minerale del suolo o possono allontanarsi dal sistema attraverso la fase solubile.
- 2) *Frammentazione* da parte di animali del suolo che provocano la degradazione di strutture organiche in parti più piccole, il che provvede a fornire cibo agli organismi del suolo e superfici disponibili per la colonizzazione microbica.
- 3) *Trasformazione chimica* di sostanza organica morta per l’attività di batteri e funghi.

La *lisciviazione* è il processo che regola le primissime fasi della decomposizione e determina una elevata velocità della perdita di massa della lettiera quando questa si deposita sul suolo. Nelle foglie senescenti avvengono dei fenomeni di “recupero” di composti che vengono trasformati in prodotti più semplici e traslocati ad altre parti vive della pianta: tali processi risultano ancora attivi nelle foglie che raggiungono il suolo, per cui i composti idrosolubili o comunque “labili”, quali zuccheri semplici (mono- e oligosaccaridi), fenoli, idrocarburi e gliceridi, vengono immediatamente persi in questa prima fase (Chapin et al., 2002; Berg & McClaugherty, 2003).

La *frammentazione* della lettiera avviene essenzialmente ad opera degli animali del suolo, che provocano anche un “rimescolamento” delle particelle, sebbene i fattori climatici rappresentino ulteriori cause della riorganizzazione della struttura della lettiera. Sia le pareti cellulari rinforzate da lignina negli organismo vegetali, sia la pelle o l’esoscheletro degli animali, limitano l’attacco microbico: il processo di frammentazione abbatte queste barriere facilitando così la decomposizione microbica.

La *trasformazione chimica* avviene ad opera di diversi organismi, primi tra i quali vi sono i funghi.

I funghi agiscono soprattutto nei primi stadi della decomposizione, sulla lettiera “fresca”, secernendo degli enzimi con i quali riescono a penetrare attraverso la cuticola delle foglie o la parete suberificata delle cellule radicali. In suoli con concentrazioni basse di nutrienti i funghi crescono più velocemente dei batteri grazie alla loro abilità nell’utilizzare azoto e fosforo, mentre in substrati ricchi di azoto subiscono la competizione dei batteri. Oltre ai funghi del *marciume bianco*, specializzati nella degradazione della lignina, e ai funghi del *marciume bruno*, che scindono le catene laterali della lignina portando alla formazione di composti fenolici, anche le micorrize giocano un ruolo fondamentale nel processo di decomposizione, trasformando le proteine in amminoacidi che vengono assorbiti dalla pianta ospite (Chapin et al., 2002).

I batteri presentano un elevato rapporto superficie/volume che li rende capaci di assorbire rapidamente i substrati solubili. Esistono diversi tipi di batteri: i gram-negativi che si sviluppano velocemente e sono specializzati nel crescere sui substrati labili secreti dalle radici, e i gram-positivi, come ad esempio gli Actinomiceti che presentano una struttura filamentosa simile alle ife fungine, e proprio come i funghi producono enzimi che degradano la lignina e i substrati recalcitranti. Gli Actinomiceti sono anche in grado di produrre delle sostanze fungicide per ridurre la competizione dei funghi. La maggior parte dei batteri è immobile e si muove passivamente attraverso il suolo, trasportata dall’acqua o dagli animali. Quando la colonia batterica, immobile, esaurisce il substrato, diventa inattiva, riducendo la respirazione e permanendo in questo stato di inattività metabolica anche per anni. Il meccanismo di “riattivazione” avviene in presenza di substrati labili, ad esempio per la crescita di una radice che rilascia essudati.

Per quanto riguarda gli animali del suolo, questi influenzano il processo di decomposizione frammentando e trasformando la lettiera, cibandosi di batteri e funghi e alterando la struttura del suolo. La fauna del suolo si può classificare in funzione delle dimensioni in:

Microfauna, costituita da organismi animali con una lunghezza minore di 0,1 mm, rappresentati da alcune specie di acari, nematodi e infine protozoi come ciliati e amebe. I protozoi abbondano soprattutto nella rizosfera e su substrati dove i batteri crescono rapidamente; sono solitamente mobili, consistono di una singola cellula e ingeriscono la loro preda, essenzialmente batteri e altre specie della microfauna, per fagocitosi. Quando i protozoi abbondano in un microsito, il rapporto batteri/funghi si sposta a favore dei funghi. I nematodi sono un gruppo abbondante e troficamente variegato, in cui ogni specie si specializza nel predare batteri, funghi, radici o altri animali del suolo. Sia i protozoi che i nematodi sono animali che si muovono attraverso film d'acqua o sulla superficie di particelle di suolo, per cui risentono maggiormente dello stress idrico rispetto ai funghi, alla mesofauna e alla macrofauna.

Mesofauna, include un gruppo tassonomicamente variegato di animali del suolo, da 0,1 a 2 mm di lunghezza. Questi sono animali che hanno il maggior effetto sulla decomposizione: essi infatti frammentano e ingeriscono la lettiera coperta da biomassa microbica, producendo grandi quantità di materiale fecale con superficie e umidità più alte della lettiera d'origine e che pertanto risulta più facilmente decomponibile. Tra gli organismi della mesofauna vi sono i collemboli, piccoli insetti che si cibano essenzialmente di funghi, mentre gli Acari sono un gruppo troficamente eterogeneo, morfologicamente simili a ragni, che si nutrono di lettiera in decomposizione e di batteri e/o funghi.

Macrofauna, rappresentata da organismi di lunghezza tra i 2 e 20 mm, come lombrichi e termiti che modificano le proprietà del suolo e della lettiera. Queste specie "riorganizzano" la struttura del suolo e ne aumentano l'aerazione, scavando canali, che possono essere attraversati dall'acqua e penetrati da radici, frammentano la lettiera,

ingeriscono e “rimescolano” particelle di suolo. I lombrichi sono più abbondanti nelle zone temperate, mentre le termiti dominano nei suoli tropicali. Le termiti ingeriscono frammenti di lettiera di piante, digeriscono la cellulosa con l’aiuto mutualistico di protozoi presenti nel loro intestino e rimescolano la sostanza organica presente nel suolo.

La pedofauna è di fondamentale importanza per le dinamiche dei nutrienti; le variazioni nella predazione dei microbi da parte degli animali altera il turnover di carbonio e azoto nel suolo e la trasformazione di diversi composti (Chapin et al., 2002).

Inoltre la pedofauna può intervenire nel ciclo degli IPA (Van Brummelen et al., 1996; Uffindell et al., 2005). Infatti è stata evidenziata una relazione tra concentrazione di IPA in alcune specie di isopodi e lombrichi e contenuto di IPA nel suolo, in particolar modo a livello dell’humus e dello strato di frammentazione che rappresentano i substrati di pascolo per questi organismi (Van Brummelen et al., 1995).

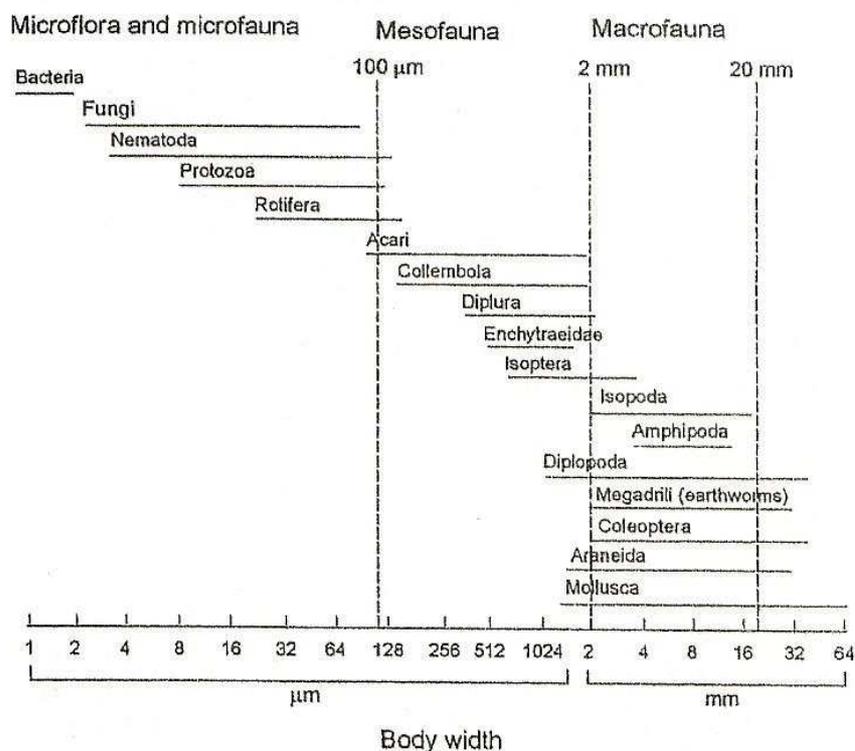


Figura 3.1 Dimensioni dei gruppi più rappresentativi della fauna del suolo. (Swift et al., 1979).

3.2 Lo studio della decomposizione

Durante la decomposizione della lettiera, la massa decrementa nel tempo approssimativamente in modo esponenziale. Di solito le foglie della lettiera perdono dal 30 al 70% della loro massa nel primo anno e dal 20 al 30% nei successivi cinque-dieci anni (Haynes, 1986). Il declino esponenziale nella massa della lettiera implica che una quantità costante di lettiera viene decomposta ogni anno; pertanto, l'equazione che descrive il modello esponenziale, risulta:

$$L_t = L_0 * e^{-kt}$$

Ovvero:

$$\ln L_t / L_0 = -kt$$

dove L_0 è la massa della lettiera al tempo 0 e L_t è la massa al tempo t. La costante di decomposizione k è un esponente che caratterizza il tasso di decomposizione di un particolare materiale. Il “tempo di residenza” ovvero il tempo richiesto affinché la lettiera si decomponga in condizioni costanti equivale a: $-1/k$. La costante di decomposizione varia ampiamente con la composizione del substrato. Gli zuccheri, per esempio, hanno un tempo di residenza dell'ordine di ore, mentre la lignina dell'ordine di mesi o decenni, a seconda della tipologia dell'ecosistema. La lettiera, generalmente, ha un tempo di residenza di mesi o anni mentre la sostanza organica mista al suolo minerale ha un tempo di residenza da anni a secoli. Il processo di riduzione della massa nel tempo è descritto più accuratamente da una curva con almeno tre fasi. Durante la prima fase, la lisciviazione di composti solubili è il processo dominante: la lettiera fresca può perdere il 5% della sua massa in 24 h soltanto per l'azione di questo processo. La seconda fase della decomposizione avviene più lentamente e coinvolge un insieme di processi quali frammentazione ad opera di animali del suolo, alterazione chimica ad opera di microbi del suolo e lisciviazione dei prodotti della decomposizione dalla lettiera.

Un metodo per studiare la decomposizione durante la seconda fase consiste nel misurare la perdita di massa da foglie, radici e rami posti in sacchetti pesati periodicamente (Robertson & Paul, 2000). In tal caso si parla del metodo delle “*litter bags*”, usato per incubazioni in campo o in microcosmi in laboratorio. Questa tecnica però permette di misurare la decomposizione come perdita di massa senza distinguere tra ciò che viene rilasciato come CO₂ e ciò che viene perso attraverso la lisciviazione o la frammentazione (Berg & McLaugherty, 2003).

L’ultima fase della decomposizione avviene più lentamente e consiste in fenomeni di alterazione chimica della sostanza organica mista al suolo minerale e la lisciviazione dei prodotti frammentati verso altri strati del suolo. La decomposizione durante questa fase è spesso stimata mediante misure di respirazione del suolo. La respirazione microbica è favorita dalla umidità e dal range di temperature che favoriscono l’attività microbica, per cui risulta più alta durante la stagione di massima crescita delle piante. La respirazione eterotrofica inizia prima e finisce più tardi rispetto alla crescita delle piante: essa infatti si prolunga in autunno e in inverno, molto più tardi rispetto alla senescenza delle foglie. L’attività microbica è anche influenzata dalla stagionalità dell’attività delle piante. Infatti il *turnover* delle radici e il rilascio di essudati, sono più cospicui nel periodo di maggiore attività fotosintetica. La senescenza autunnale fornisce un ulteriore substrato che contribuisce all’ultimo stadio della respirazione del suolo (Chapin et al., 2002).

Scopo della ricerca

Questa ricerca è inserita nell'ambito di un Progetto di Ricerca Nazionale (PRIN 2004) dal titolo: "*Gradienti spazio-temporali di ozono troposferico e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in siti della regione Campania a diverso impatto. Valutazione degli effetti sulla vegetazione e sul processo di decomposizione*". Lo scopo del lavoro è:

1) Verificare la relazione tra accumulo di IPA e concentrazione di lipidi in foglie di *Quercus ilex* L. e la variazione dell'accumulo di IPA con l'età delle foglie, al fine di ampliare le conoscenze utili per poter meglio utilizzare il leccio come biomonitor della contaminazione atmosferica da IPA negli ambienti in cui questa specie arborea è presente.

L'estrazione dei lipidi dalle foglie e la determinazione del loro contenuto consente di verificare se l'accumulo di IPA è funzione di questa componente cellulare alla quale gli IPA preferenzialmente si legano a causa della loro elevata lipofilia. La determinazione del contenuto di IPA nelle foglie di generazioni diverse permette inoltre di studiare l'accumulo di questi inquinanti in funzione dell'età delle foglie oltre che del sito e quindi della qualità ambientale.

2) Evidenziare, attraverso l'apporto dei singoli IPA al contenuto totale, fonti diverse di emissione in funzione della tipologia dei siti di campionamento.

3) Definire gradienti spaziali di contaminazione in funzione dell'accumulo di IPA nelle foglie.

4) Studiare gli effetti dell'accumulo di IPA sul processo di decomposizione della lettiera di foglie.

5) Seguire la dinamica degli IPA durante la decomposizione della lettiera di foglie.

La ricerca mira infatti a valutare il ciclo degli IPA in natura; lo studio del processo di decomposizione permette di definire la degradabilità o permanenza degli IPA nella lettiera di foglie durante le varie fasi del processo e allo stesso tempo permette di verificare l'influenza dell'accumulo degli IPA nelle foglie sul tasso di decomposizione.

Ciò nasce dall'esigenza di affrontare uno studio che non trova molti riscontri in letteratura. Poche sono infatti le ricerche relative alla dinamica di tali inquinanti durante

il processo di senescenza, caduta delle foglie e decomposizione della lettiera, mentre più numerosi risultano gli studi sulla trasformazione degli IPA, in ambiente controllato, ad opera di organismi decompositori.

Materiali e metodi

4. Analisi di foglie di leccio

4.1 Il leccio

Il leccio, *Quercus ilex* L., è una quercia sempreverde, caratteristica delle aree mediterranee, appartenente alla famiglia delle Fagacee. Tale specie è diffusa principalmente nelle zone sub-umide del bacino del Mediterraneo e nel Medio-Oriente. L'areale di distribuzione si estende longitudinalmente dal Portogallo alla Siria e latitudinalmente dal Marocco e dall'Algeria fino alla Francia (Debazac, 1983). In Italia si ritrova a diversi livelli altitudinali: sino a 700 m s.l.m. nelle regioni settentrionali e sino a 1500 m s.l.m. in quelle meridionali.

Il leccio è ampiamente diffuso sia in aree remote, dove forma associazioni pure dette leccete, sia in aree urbane e industriali, in parchi e lungo le strade. L'apparato radicale del leccio è molto profondo e si adatta facilmente ad una vasta gamma di terreni, sebbene non attecchisca facilmente in suoli argillosi o con ristagno idrico.

Le caratteristiche morfologiche delle foglie del leccio e l'ampia diffusione di questa specie in ambiente urbano, la rendono particolarmente idonea come biomonitore di inquinanti atmosferici (Alfani et al., 1989; Valerio et al., 1989; Alfani et al., 1995; Monaci & Bargagli, 1997). Essendo una specie sempreverde, le sue foglie sono esposte agli inquinanti durante tutto l'arco dell'anno per cui l'analisi dei tessuti fogliari permette di ottenere un valore integrato nel tempo della deposizione atmosferica.

Le foglie del leccio di forma lanceolata appaiono di colore verde brillante sulla pagina superiore e verde chiaro su quella inferiore, caratterizzata da un fitto strato di peli stellati (Pignatti, 1982). Le foglie sono coriacee (Fig. 4.1 a), soprattutto negli ambienti aridi e assolati e il loro periodo di persistenza varia da uno a tre-quattro anni a seconda delle caratteristiche del clima e dell'habitat in cui la pianta si trova (Terradas, 1999). La crescita vegetativa si ha verso maggio-giugno nei pendii esposti a nord ed è anticipata di circa un mese in zone pianeggianti. Dopo l'apertura delle nuove foglie nel periodo di maggio-giugno, la crescita dei getti si arresta in luglio. A volte una nuova generazione

di foglie può essere prodotta verso settembre, dopo il periodo di aridità estiva (De Lillis & Fontanella, 1992). Gli stomi sono solitamente molto piccoli in questa specie (22-27 μm) e la loro apertura e chiusura risponde molto bene alla differente disponibilità di acqua, tanto che il leccio è considerato una specie idro stabile (Larcher, 1995).

Le caratteristiche morfologiche delle foglie di leccio quali superficie, cere cuticolari, peli e numero di stomi, giocano un ruolo fondamentale nell'assorbimento e accumulo degli IPA (Jouraeva et al., 2002). Le foglie di *Q. ilex* che presentano peli sulla superficie fogliare tendono ad accumulare quantità totali di IPA più alte rispetto a foglie che non presentano peli, in quanto nelle prime è maggiore sia la superficie fogliare che intercetta il particolato atmosferico, sia lo strato limite che facilita la deposizione degli IPA presenti in atmosfera (Howsam et al., 2000). Nel leccio sia la superficie adassiale che quella abassiale delle foglie sono pubescenti, sebbene la lamina ventrale risulta più efficiente nel "catturare" il particolato atmosferico (Rauret et al., 1994) grazie alla maggiore presenza di peli stellati (Fig 4.1 b). Alcuni studi hanno inoltre messo in luce l'importanza dei lipidi e delle cere cuticolari delle foglie di leccio nell'accumulo di IPA, a causa della elevata lipoficità di questi inquinanti (Simonich & Hites, 1994; Howsam et al, 2000).

a**b**

Figura 4.1 *a* Foglie di *Q. ilex*. *b* Peli stellati della pagina inferiore delle foglie, a forte ingrandimento (www.funghiitaliani.it/Alberi/Quercia/Quercia.htm).

Alcuni autori (Monaci et al., 2000) hanno valutato la possibilità di impiegare le foglie di leccio per monitorare la contaminazione da metalli, associati alla frazione inalabile (PM₁₀) del particolato atmosferico, emessi dal traffico veicolare. Lo studio ha evidenziato l'efficienza del leccio come biomonitor in quanto le sue foglie tendono ad accumulare i metalli in funzione del tempo di esposizione (ovvero in relazione all'età delle foglie). In particolar modo le foglie di un anno con la loro superficie ampia e la cuticola e i tricomi già ben sviluppati, mostrano un'alta capacità di accumulare i metalli, quali Ba, Cr, Fe, Mn, Pb, Zn, che risultano anche i principali componenti del PM₁₀.

Negli ultimi anni l'impiego del leccio in studi di biomonitoraggio degli IPA (Alfani et al., 2001, 2005; De Nicola et al., 2005), ha dimostrato l'idoneità di questa specie come biomonitor in quanto l'accumulo di IPA nelle sue foglie permette di ottenere importanti informazioni sui gradienti di contaminazione spaziale e temporale di tali inquinanti in atmosfera.

4.2 Siti di campionamento

In questa ricerca sono state analizzate foglie di leccio prelevate in 12 siti per l'area di Napoli (Fig. 4.2 a): la Tangenziale (TG), via Capodimonte (VCM), p.le Tecchio (PT), via Miano (VM), p.zza Medaglie d'Oro (PM), Villa Floridiana (VF), l'ex Italsider di Bagnoli (BA), la zona Posillipo (PO), la zona Policlinico (PL), la zona CTO (CTO), viale Maddalena (VMD), via Acton (VA), e in 7 siti nell'area di Salerno (Fig. 4.2. b): zona collinare interna dell'Arechi (AI), zona collinare dell'Arechi su strada urbana (ASU), Villa Comunale (VC), Mercatello in prossimità della ferrovia (ME), via Torrione (TO), un'area di servizio lungo l'autostrada Pontecagnano-Salerno (AS) e infine una zona in prossimità di una fonderia di Fratte (FF). Inoltre due aree remote, il Vesuvio, (VS, Fig. 4.2 a), e il Monte Tubenna (MT, Fig. 4.2 b), sono state scelte come controllo, rispettivamente per Napoli e Salerno.

Nei siti urbani gli alberi di leccio si trovano in parchi, giardini o in grandi aiuole (Fig. 4.3 a, b, c, d, e), sebbene in alcuni casi su terreni con notevole copertura erbacea e abbondante strato di lettiera (VF, BA, VM, CTO, TG e VCM a Napoli e AI, ASU e ME a Salerno), in altri casi su terreni compatti con presenza di prato e lettiera (PO, PL, VMD, AS), oppure su terreni parzialmente cementificati con lettiera scarsa o pressoché assente (VA, PT, PM, TO, FF, VC).

Tutte le zone suddette, nelle aree di Napoli e Salerno, sono prossime a strade con elevato traffico veicolare per un cospicuo numero di ore al giorno, o vicine a luoghi interessati da attività industriali: proprio in quanto sottoposti a situazioni di stress, tali siti sono oggetto della nostra ricerca.

Le aree di controllo sono rappresentate invece da una lecceta nel Parco Nazionale del Vesuvio, a circa 12 km da Napoli (Fig. 4.3 f) e l'altra da un nucleo di lecci sul M.te Tubenna (Massiccio dei Picentini), a circa 15 km da Salerno.

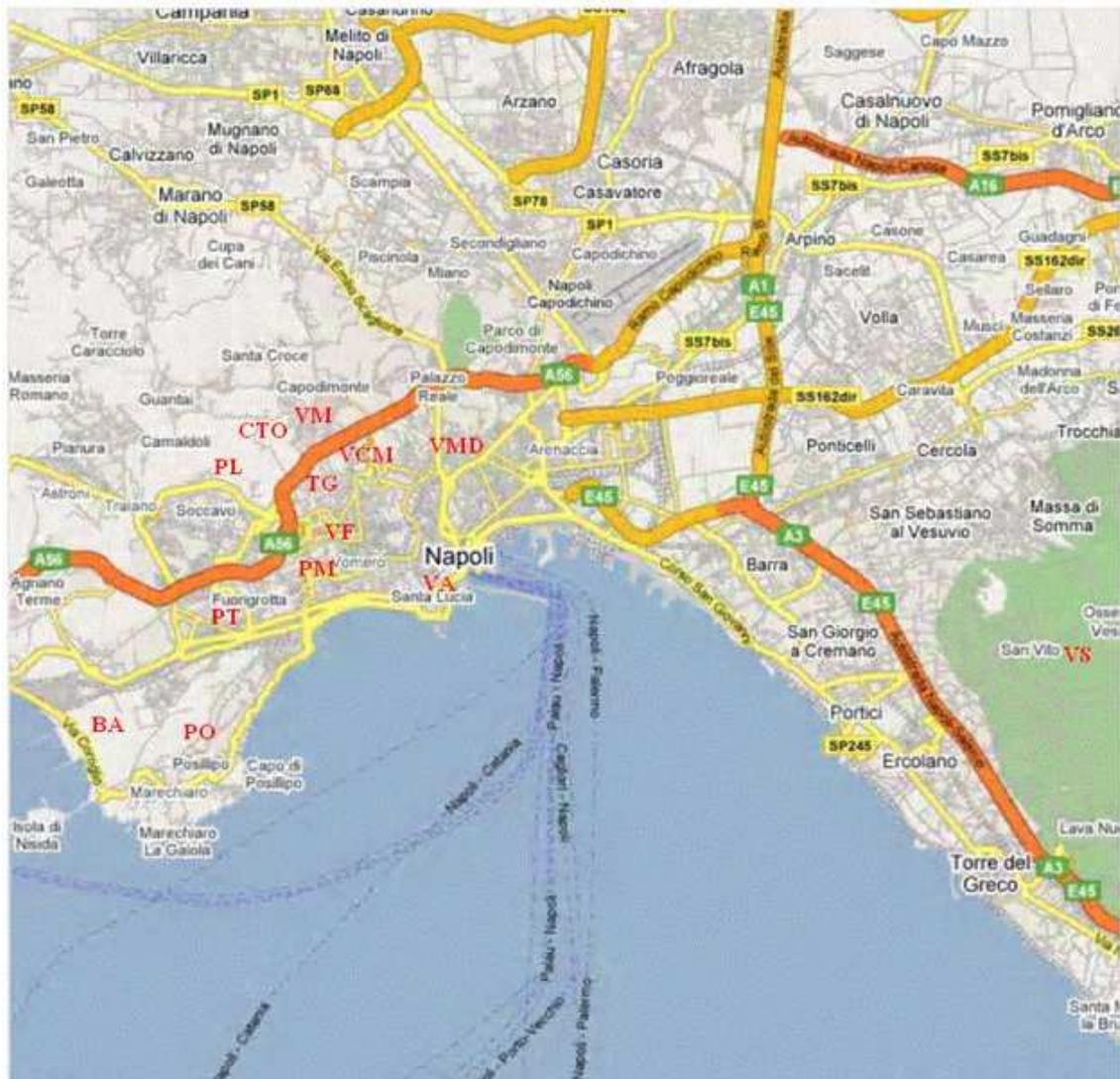


Figura 4.2 a. Mappa dei tredici siti a Napoli in cui è stato effettuato il campionamento: Villa Floridiana (VF), ex Italsider di Bagnoli (BA), zona Posillipo (PO), via Miano (VM), zona Policlinico (PL), zona CTO (CTO), Tangenziale (TG), via Maddalena (VMD), via Acton (VA), p.le Tecchio (PT), p.zza Medaglie d'Oro (PM), via Capodimonte (VCM), e Vesuvio (VS).



Figura 4.2 b. Mappa degli otto siti a Salerno in cui è stato effettuato il campionamento: zona collinare interna dell'Arechi (AI), zona collinare dell'Arechi su strada urbana (ASU), Villa Comunale (VC), Mercatello in prossimità della ferrovia (ME), via Torrione (TO), un'area di servizio lungo l'autostrada Pontecagnano-Salerno (AS), zona fonderia di Fratte (FF), e M.te Tubenna (MT).



Figura 4.3 a. Tangenziale (TG).



Figura 4.3 b. Via Capodimonte (VCM).



Figura 4.3 c. P.le Tecchio (PT).



Figura 4.3 d. Via Miano (VM).



Figura 4.3 e. P.zza Medaglie d'Oro (PM).

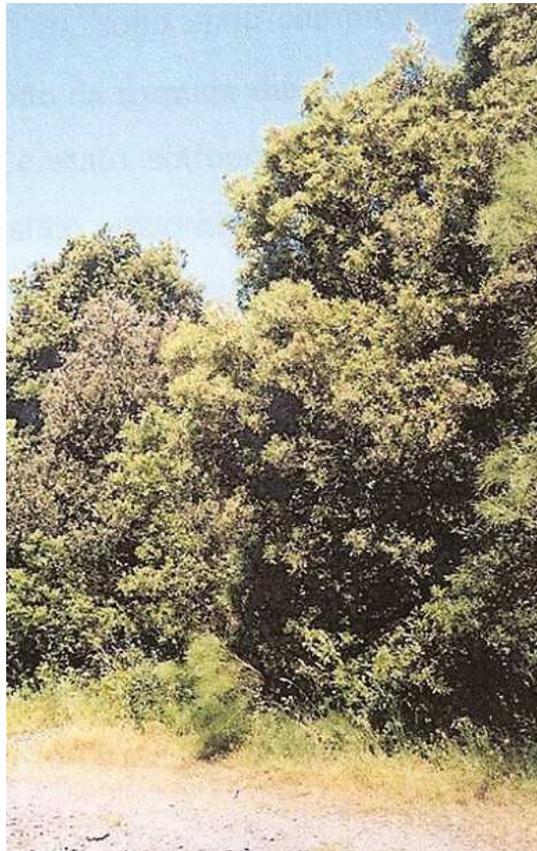


Figura 4.3 f. Vesuvio (VS).

4.3 Prelievo in campo e trattamento dei campioni

I campionamenti sono stati effettuati dal 9 al 23 marzo del 2005. Da un numero di alberi compreso tra cinque e dieci per ogni sito è stato prelevato un notevole numero di rami terminali (30-40) dai quali in laboratorio sono state staccate e tenute separate foglie di 1, 2 e 3 anni di età.

Successivamente le foglie private di piccioli sono state pulite da ragnatele e parassiti avendo cura di non rimuovere il deposito.

Per ogni classe di età, le foglie sono state suddivise in due sub-campioni: uno congelato a -20°C per l'estrazione degli IPA, l'altro seccato in stufa (95°C), fino al raggiungimento di peso costante, per definire il tenore idrico delle foglie (% p.s.) e per l'estrazione dei lipidi.

4.4 Determinazione dei lipidi

La determinazione dei lipidi è stata effettuata seguendo la metodica proposta da Simonich e Hites (1994), adeguatamente modificata, (Fig. 4.4 a). Circa 3 g di foglie fresche, sono state seccate in stufa a 95°C per 24 h e successivamente è stato determinato il peso secco. Le foglie seccate in stufa sono state poste in becker da 400 ml e sonicate (Misonix, XL 2020, Fig. 4.6 a) in 100 ml di miscela esano:acetone (1:1=v:v) per 1 h alla massima intensità in continuo e l'estratto filtrato con filtri di carta Whatman n. 40. L'estratto è stato quindi raccolto in contenitori di alluminio di cui era stata precedentemente misurata la tara. Alle foglie recuperate sono stati aggiunti altri 100 ml di miscela ed è stata effettuata una seconda sonicazione con le stesse modalità della precedente. L'estratto proveniente dalla seconda sonicazione è stato filtrato e aggiunto a quello raccolto dopo la prima sonicazione e lasciato evaporare. Dopo la completa evaporazione i contenitori di alluminio sono stati pesati e il contenuto in lipidi

determinato per differenza di peso, riferendolo al peso secco di ogni singolo campione di foglie. Tutte le misure sono state condotte su tre campioni di foglie.

4.5 Determinazione degli IPA

La determinazione degli IPA è stata effettuata utilizzando la metodica descritta in De Nicola et al. (2005), (Fig. 4.4 b). A circa 5 g di foglie fresche è stata aggiunta una eguale quantità di sodio solfato anidro (Na_2SO_4), essiccato in muffola a 400°C per 4 ore, per eliminare la possibile interferenza con acqua. Le foglie sono state estratte in 300 ml di miscela acetone-diclorometano (1:1= v:v) in 3 successive sonicazioni (Misonix, XL 2020), ognuna della durata di tre minuti e in modalità pulsata, per evitare il surriscaldamento del campione. L'estratto filtrato sottovuoto (Whatman n. 40, Fig. 4.6 b) è stato poi ridotto di volume (circa 5 ml) mediante evaporatore rotante (Fig. 4.6 c). Dopo filtrazione con filtri in membrana PTFE (con pori di 0.2 μm), l'estratto è stato portato a secco in vials sotto flusso di un gas inerte e diluito con 4 ml di cicloesano.

L'analisi quantitativa degli IPA nei campioni è stata realizzata mediante un gascromatografo (Hewlett-Packard 5890 GC) con colonna capillare accoppiato ad uno spettrometro di massa (Hewlett-Packard 5971), (Fig. 4.6 d). L'analisi è stata condotta su 1 μl di campione prelevato ed iniettato in manuale in modalità *on-column* in una colonna HP-5MS, lunga 30 m, con diametro interno di 0,25 mm, e con spessore del film di 0.25 μm e rapporto di fase 250. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio mantenuto in condizioni di flusso costante di 1,11 ml/min. La temperatura del forno è stata programmata in modo da seguire una rampa lineare da 70°C a 280°C, con uno step di 20°C al minuto, e rimanere al regime costante di temperatura di 280°C per 24 minuti. L'iniettore è stato programmato in modo che la temperatura fosse 3°C superiore a quella della stufa (modalità *oven track*) e con una pressione iniziale a 70°C in testa alla colonna di 70 KPa. L'acquisizione dei dati è stata svolta in modalità SIM (*selected ion monitoring*).

Il rivelatore selettivo di massa è stato impostato in modo da acquisire le seguenti masse:

Tempo (min)	Masse da rilevare (amu)
3,00-6,00	128, 136
6,00-7,00	152, 154, 166, 164
7,00-9,00	178, 188
9,00-11,00	202, 216
11,00-13,00	228, 226, 240
13,00-16,00	252, 306, 264
16,00-30,00	276, 278

Per l'impostazione delle diverse finestre temporali sono stati analizzati standards di tutti i singoli IPA studiati e valutati i loro tempi di ritenzione.

Per la determinazione quantitativa degli IPA sono state approntate delle curve di calibrazione ottenute preparando cinque diluizioni a concentrazione nota 1:10, 1:20, 1:100, 1:200, 1:1000, rispettivamente, dello standard mix 45 (Dr. Ehrenstorfer GmbH) che contiene la stessa concentrazione (10 mg/l) per ognuno dei 17 IPA costituenti: naftalene (Naph), acenaftilene (Ace), acenaftene (Act), fluorene (Fln), fenantrene (Phen), antracene (Antr), fluorantene (Flnt), pirene (Pyr), benzo[a]antracene (BaA), crisene (Chr), benzo[b,k]fluorantene (BbKF), benzo[e]pirene (BeP), benzo[a]pirene (BaP), perilene (Peril), indeno[1,2,3,c-d]pirene (IcdP), dibenzo[a,h]antracene (DahA), benzo[g,h,i]perilene (BghiP). Le concentrazioni degli IPA sono state corrette considerando il recupero di una quantità nota (0,25 ml) di una miscela di 5 standard deuterati (naftalene D8, acenaftene D10, fenantrene D10, crisene D10, e perilene D12) a concentrazione nota (1 µg/ml), aggiunta in ogni campione prima delle analisi. Tutte le analisi sono state condotte su tre campioni di foglie.

Per riferire le concentrazioni di IPA rispetto al peso secco, ogni singolo campione, dopo l'estrazione, è stato seccato in stufa a 75 °C, fino al raggiungimento di peso costante.

La determinazione quantitativa degli IPA è stata effettuata utilizzando le apparecchiature (GC-MS) dell'Istituto Motori del CNR.

Il limite di rilevabilità dello strumento (*LOD = limit of detection*), che corrisponde ad un segnale strumentale significativamente differente da quello del bianco, è stato calcolato come:

$$LOD = y_b + k s_b$$

Dove: y_b = segnale del bianco; s_b = deviazione standard del bianco; $k = 3$, valore per il quale vi è una probabilità pari a 0,135% di attribuire all'analita un segnale del bianco.

Dal valore LOD, attraverso i parametri a (pendenza) e b (intercetta) della retta di calibrazione in prossimità dell'origine, si ricava la concentrazione minima rilevabile, C_L :

$$C_L = (LOD - b) / a$$

Nel nostro caso la concentrazione minima rilevabile è risultata variare nel range 2-10 ng/g p.s. in relazione all'IPA analizzato.

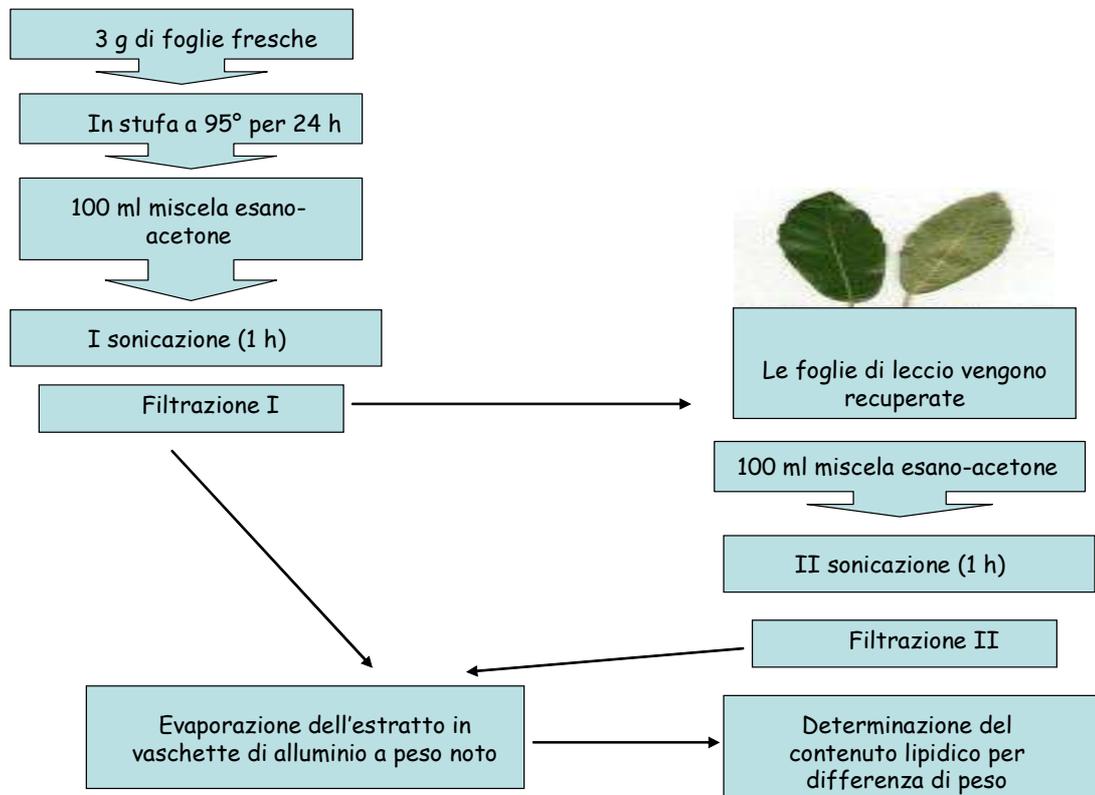


Figura 4.4 a Schema della metodica per la determinazione dei lipidi in foglie di leccio (Simonich & Hites, 1994).

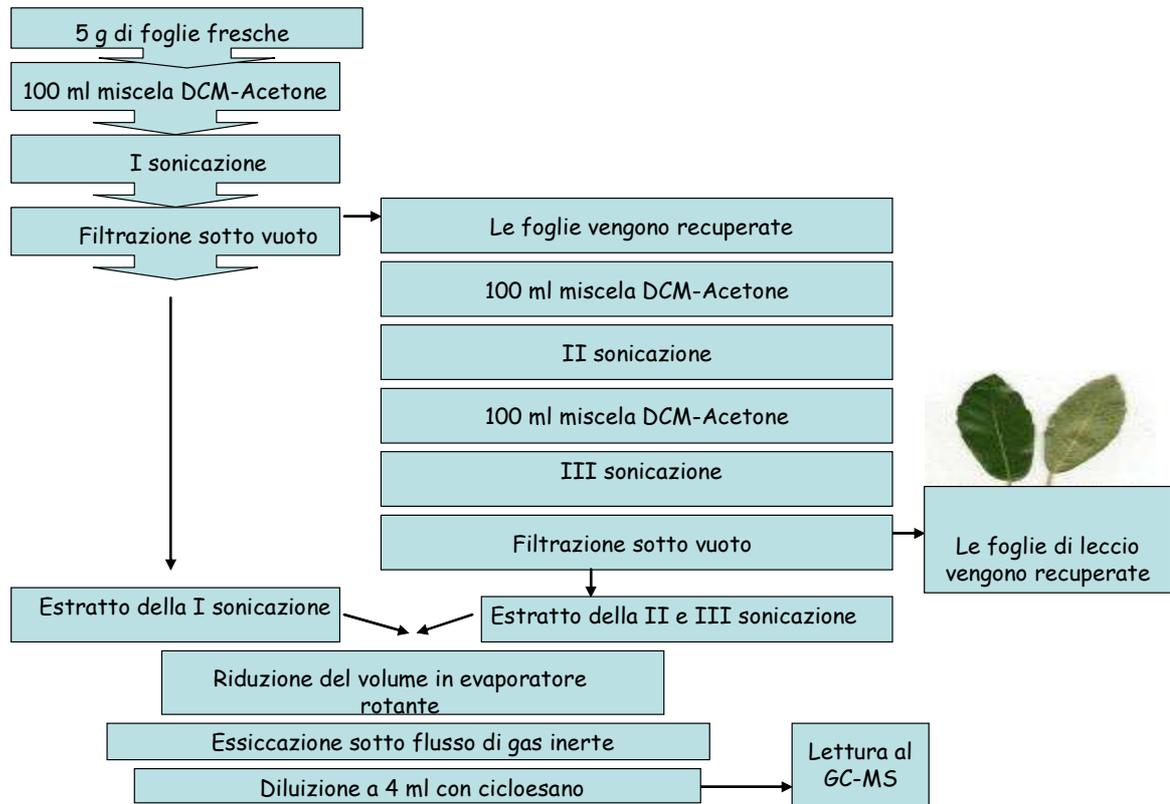


Figura 4.4 b Schema della metodica per la determinazione degli IPA in foglie di leccio (De Nicola et al., 2005).

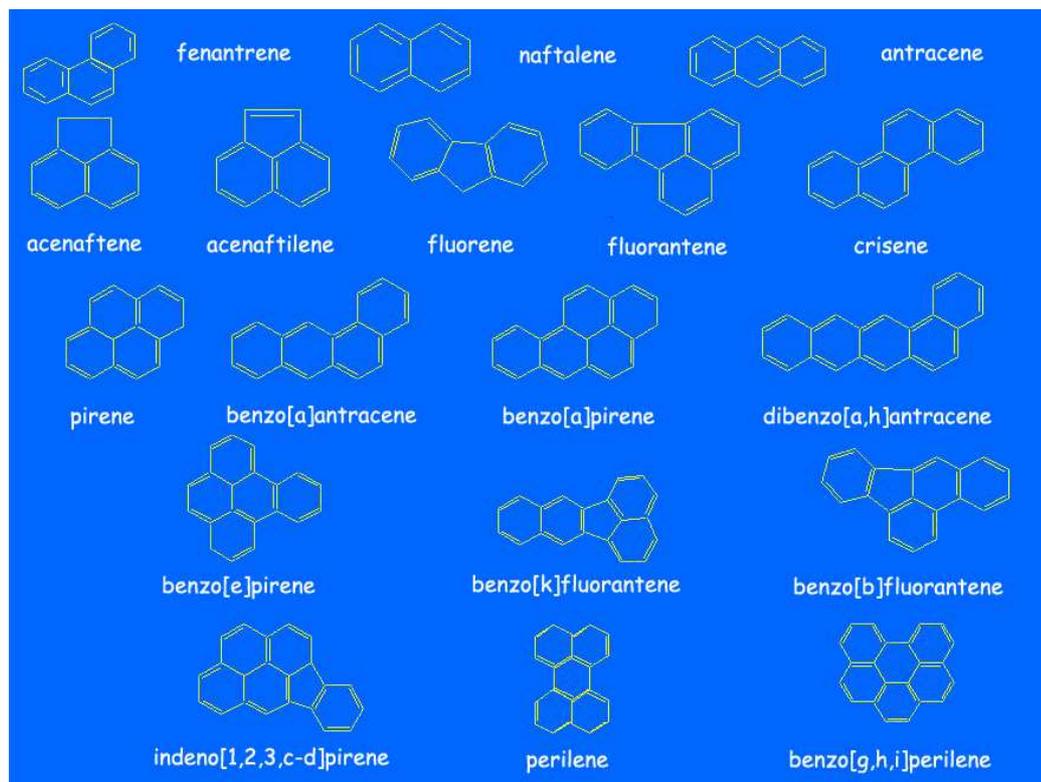


Figura 4.5 Formule di struttura degli IPA monitorati

IPA	Formula	N. Massa (amu)	N. anelli benzenici	M/Z
Naftalene	$C_{10}H_8$	128	2	128.06
Acenaftilene	$C_{12}H_8$	152	2	128.06
Acenaftene	$C_{12}H_{10}$	154	2	154.06
Fluorene	$C_{13}H_{10}$	166	2	166.07
Fenantrene	$C_{14}H_{10}$	178	3	178.08
Antracene	$C_{14}H_{10}$	178	3	178.08
Fluorantene	$C_{16}H_{10}$	202	3	202.08
Pirene	$C_{16}H_{10}$	202	4	202.08
Benzo[a]antracene*	$C_{18}H_{12}$	228	4	242.11
Crisene	$C_{18}H_{12}$	228	4	228.09
Benzo[b,k]fluorantene*	$C_{20}H_{12}$	252	4	252.09
Benzo[e]pirene	$C_{20}H_{12}$	252	4	252.09
Benzo[a]pirene*	$C_{20}H_{12}$	252	5	252.09
Perilene	$C_{20}H_{12}$	252	5	252.09
Indeno[1,2,3,c,d]pirene*	$C_{22}H_{12}$	276	5	276.09
Dibenzo[a,h]antracene*	$C_{22}H_{14}$	278	5	278.11
Benzo[g,h,i]perilene	$C_{22}H_{12}$	276	5	276.09

Tabella 4.1. Caratteristiche degli IPA monitorati. (*) IPA cancerogeni.



Figura 4.6 a Sonicatore Misonix XL 2020.

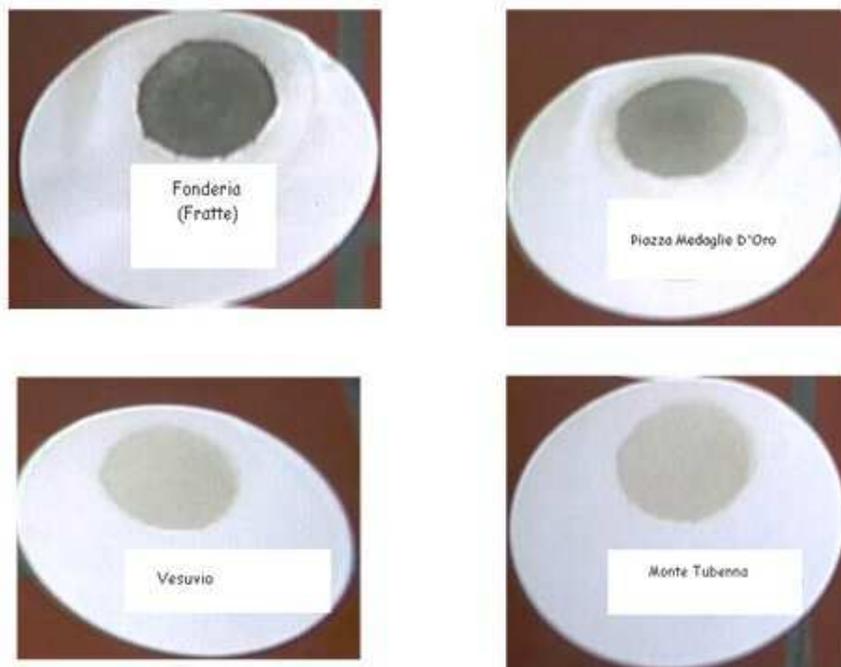


Figura 4.6 b Filtri di carta Whatman n. 40 dopo la filtrazione dei campioni. Si può notare il maggiore deposito di particolato sui filtri impiegati per gli estratti di foglie provenienti dai siti industriali e urbani rispetto a quelli remoti.



Figura 4.6 c Evaporatori rotanti per la riduzione del volume degli estratti.



Figura 4.6 d Strumento impiegato per la determinazione degli IPA, il GC-MS.

4.6 Cenni di gas-cromatografia e di rilevazione mediante spettrometria di massa

Il riconoscimento degli IPA presenti nei campioni è stato realizzato, come accennato, con l'ausilio di un gas-cromatografo (GC) interfacciato ad un rivelatore a spettrometria di massa (MS).

La gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa è attualmente la tecnica più comunemente utilizzata per l'analisi di inquinanti organici volatili in campioni ambientali in quanto combina il vantaggio della separazione di miscele della tecnica gas cromatografica con le capacità di riconoscimento e quantificazione della spettroscopia di massa.

Il sistema consiste in: 1) una sorgente di gas di trasporto, generalmente l'elio; 2) un iniettore che può essere riscaldato; 3) una colonna in ambiente controllato in temperatura; 4) un rivelatore adatto per i campioni in fase gassosa.

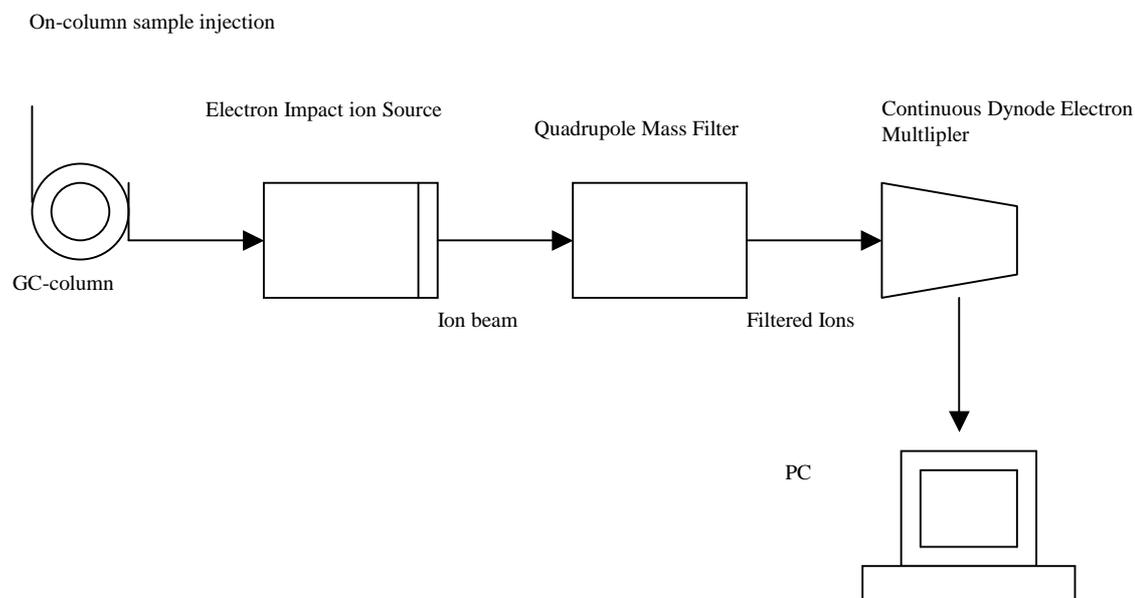
La gas-cromatografia ad alta risoluzione, o capillare, adopera una colonna tubolare con un film della fase stazionaria sulle pareti interne. La colonna capillare è realizzata in silice fusa, molto resistente e flessibile e con una superficie interna che migliora le prestazioni del capillare e diminuisce l'assorbimento dei componenti attivi. Lo scopo della gas-cromatografia è quello di separare miscele complesse, componenti fortemente relazionate chimicamente e fisicamente o anche miscele consistenti in una vasta gamma di componenti. Uno dei rilevatori più frequentemente utilizzati è quello a spettrometria di massa.

Le sostanze introdotte nello spettrometro sono trasformate in ioni per mezzo di un fascio elettronico di energia appropriata (70-eV); gli elettroni sono generati da un filamento incandescente di tungsteno. Gli ioni formati si frammentano, vengono accelerati, focalizzati ed analizzati in funzione del loro specifico rapporto massa/carica (m/z); si ottiene così una rappresentazione, lo spettro di massa, che è unica per ogni composto.

In particolare, nello strumento utilizzato l'analizzatore è un quadrupolo di silice fusa a geometria iperbolica: il flusso di ioni attraversa uno spazio a sezione quadrata al centro di quattro barre orizzontali parallele alle cui coppie diagonalmente opposte vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fisso, unito ad un

altro oscillante, fa muovere gli ioni secondo traiettorie sinusoidali consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. Il rivelatore è un dinodo, cioè un moltiplicatore elettronico capace di amplificare la debolissima corrente prodotta dagli ioni che hanno superato l'analizzatore. I segnali ottenuti in questo modo vengono poi trasmessi ad un calcolatore in grado, con l'opportuno software, di rappresentare l'abbondanza di ogni ione in funzione della sua massa, cioè lo spettro di massa finale.

In basso è riportato uno schema dello strumento:



5. Trattamento dei campioni e metodologie impiegate nello studio della decomposizione della lettiera di foglie

Per lo studio della dinamica della decomposizione della lettiera di foglie di leccio (metodo delle *litter bags*) sono stati scelti tre siti di campionamento a diverso grado di contaminazione: un sito urbano (PM), un sito industriale (FF) e un sito remoto (VS).

Le foglie, prelevate nel dicembre 2005, private di picciolo e pulite da ragnatele e parassiti avendo cura di non rimuovere il deposito, sono state scelte in modo da costituire un campione omogeneo e rappresentativo delle tre generazioni. Una parte di esse è stata congelata a -20°C per misurare la concentrazione degli IPA nelle foglie verdi.

Le altre foglie sono state invece tenute all'aria per circa due mesi per permetterne la stabilizzazione, cioè il raggiungimento di peso costante. Successivamente tali foglie (circa 3 g) sono state inserite in *bags* di nylon (Fig. 5.1 a) con maglie di 1 mm e incubate in mesocosmi. Per l'allestimento dei mesocosmi, in contenitori di plastica di 40 x 70 cm sono state poste zolle di terreno superficiale (0-10 cm) prelevato da una lecceta sulla collina dell'Arechi a Salerno, senza allontanare la lettiera e lasciando inalterato il profilo. Il 29 marzo 2006 le foglie, poste nelle *bags* sono state dunque adagiate sulla lettiera dei mesocosmi e incubate in camera buia (Fig. 5.1 b), in condizioni controllate di temperatura (28°C) e di umidità relativa U.R. (70%).

Il numero dei sacchetti (*litter bags*) allestito per il mesocosmo del sito remoto VS è stato inferiore rispetto agli altri, a causa della scarsità di foglie di tre anni presenti in questo sito.

Una parte di foglie stabilizzate è stata seccata in stufa per la determinazione del tenore idrico, un'altra parte è stata congelata a -20°C per la determinazione degli IPA.

Dopo 39, 105, 177, 246, 303 e 361 giorni di incubazione sono stati prelevati 5 sacchetti di lettiera di foglie di ciascun sito per la determinazione della perdita di peso, e 6 sacchetti per la determinazione della concentrazione di IPA (12 sacchetti nell'ultimo prelievo dove la decomposizione di foglie ha richiesto un maggior numero di campioni). Le foglie immediatamente dopo il prelievo dai sacchetti sono state ripulite dai residui di terreno, di ife fungine e piccoli invertebrati.

Le concentrazioni di IPA sono state determinate anche su foglie senescenti prelevate per scuotimento in maggio, periodo di massima caduta, nei siti PM, VMD, VCM, FF.

Tutte le misure sono state condotte su tre campioni di foglie.



Figura 5.1 a Esempio di *bag* di nylon in cui sono state poste le foglie di leccio per l'incubazione in mesocosmi.



Figura 5.1 b Camera termostata in cui sono stati incubati i mesocosmi.

6. Trattamento statistico dei dati

I dati sono stati trattati con test statistici di base usando il software SigmaStat. Per tutto il dataset è stata saggiata la distribuzione dei dati attraverso il test di normalità di Kolmogorov-Smirnov, al fine di poter utilizzare test statistici adeguati per dati con distribuzione gaussiana e non.

Il test ANOVA ad una via e il test ANOVA on ranks, rispettivamente per dati con distribuzione normale e non, sono stati utilizzati al fine di saggiare la significatività delle differenze delle concentrazioni di IPA, delle concentrazioni di lipidi, e del tenore idrico tra foglie di diverse classi di età, e anche tra foglie coetanee campionate nei diversi siti. Successivamente all'analisi della varianza, per valutare le differenze tra ogni coppia di set di dati sono stati applicati i test post hoc (Student-Newman-Keuls-SNK e Kruskal-Wallis, rispettivamente per dati con distribuzione normale e non).

Per tutto il periodo di osservazione del processo di decomposizione, la significatività delle differenze della perdita di peso delle tre lettiere è stata saggiata mediante il test ANOVA ad una via, e la significatività delle differenze di concentrazioni di IPA nelle lettiere dei due siti inquinati mediante il t-test di Student.

Al fine di valutare eventuali corrispondenze tra gli andamenti di diversi parametri analizzati, sono state saggiate le correlazioni con il coefficiente di Pearson e di Spearman, rispettivamente per dati con distribuzione gaussiana e non.

Risultati e discussione

7. Analisi di IPA in foglie di leccio in aree urbane, industriali e remote

7.1 Accumulo degli IPA: influenza del contenuto lipidico e dell'età delle foglie

Contenuto lipidico nelle foglie di leccio

Le concentrazioni dei lipidi nelle foglie campionate nei 21 siti presi in esame, non mostrano differenze statisticamente significative fra le tre classi di età (1, 2 e 3 anni). Un leggero incremento del contenuto lipidico è evidente in alcuni siti soprattutto nelle foglie di 3 anni (Tab 7.1). Studi condotti su aghi di pino di 1 e 2 anni hanno evidenziato che il contenuto di cere non varia in maniera significativa in funzione dell'età, piuttosto è evidente un decremento di composti lipidici nella stagione estiva dovuto alla volatilizzazione di alcune sostanze più leggere (Lehndorff & Schwark, 2004). Il contenuto di lipidi e la composizione chimica delle cere sono tipici della specie analizzata: un maggiore contenuto in alcanoli, ad esempio, è stato determinato in foglie di *Q. robur*, una quercia caducifolia, rispetto a *Q. suber* e *Q. ilex*, specie sempreverdi (Martins et al., 1999). Durante lo sviluppo fogliare la composizione chimica della cuticola tende a modificarsi: Hauke & Schreiber (1998) hanno messo in luce che in foglie d'edera (*Hedera helix* L.), osservate tra i 4 e i 202 giorni d'età, la componente apolare monomerica raggiunge una concentrazione massima dopo 30 giorni di osservazione, per poi diminuire nel successivo periodo. La frazione polare delle cere, invece, incrementa velocemente, raggiungendo un plateau dopo 40 giorni, per poi rimanere costante durante la successiva stagione. Un diverso contenuto lipidico in foglie di tre differenti stadi di crescita è stato riscontrato da Tao et al. (2006), che hanno misurato in *Oryza sativa* una maggiore concentrazione lipidica in foglie più giovani rispetto a foglie completamente mature.

Il contenuto in lipidi delle foglie di leccio mostra una forte variabilità anche tra foglie della stessa età campionate in siti diversi, con valori che variano tra 11 e 21, tra 4 e 23 e tra 11 e 28 mg/g p.s., rispettivamente per foglie di 1, 2 e 3 anni. Il contenuto lipidico nelle foglie analizzate, mediato per le tre classi di età, varia da un valore minimo di 9,3

mg/g p.s. (MT) a 22,8 mg/g p.s. (BA), sebbene non siano state evidenziate differenze statisticamente significative nelle concentrazioni di lipidi in foglie provenienti da siti di diversa tipologia (remoti, industriali ed urbani). Tuttavia, un maggior contenuto di cere cuticolari in aghi di pino di aree meno contaminate rispetto ad aree contaminate è stato riscontrato da Lehndorff e Schwark (2004).

Accumulo di IPA in funzione del contenuto in lipidi delle foglie

Gli IPA per la loro elevata lipofilicità tendono ad accumularsi preferenzialmente nella componente lipidica delle foglie ed è stato a volte evidenziato che la vegetazione con un elevato contenuto lipidico tende ad accumulare una maggiore concentrazione di IPA (Simonich & Hites, 1994 b).

Nelle foglie di leccio campionate nei siti in esame, non è stata evidenziata una relazione diretta tra accumulo di IPA e contenuto lipidico in accordo con quanto riscontrato da Howsam e collaboratori (2000) in foglie di quercia, noce e frassino.

Le concentrazioni di IPA in foglie di diverse specie sono state spesso riferite al contenuto in lipidi, componente fogliare ritenuta il *sink* per questi contaminanti, per poterne confrontare i livelli di accumulo (Simonich & Hites, 1995; Wagrowski & Hites, 1997).

Studi recenti hanno evidenziato che il contenuto in lipidi non limita l'accumulo di IPA nelle foglie esposte alla deposizione atmosferica, verosimilmente perché le componenti lipidiche non rappresentano l'unico *sink* di accumulo per questi composti (Wild et al., 2004).

Il peso secco appare più idoneo come parametro di riferimento per il contenuto di IPA delle foglie di leccio. Infatti, diversamente da quanto osservato per il contenuto in lipidi, il rapporto percentuale tra peso secco e fresco delle foglie, indice del contenuto di acqua che potrebbe essere molto variabile in foglie di altre specie, rimane abbastanza costante sia nelle tre classi di età che tra foglie dei diversi siti studiati, con valori che variano nell'intervallo da 55 a 64 % (Tab. 7.1). Tenuto anche conto dell'assenza di una

relazione diretta tra contenuto lipidico e concentrazione di inquinanti nelle foglie delle specie investigate, Howsam e collaboratori (2000) hanno suggerito come parametri più opportuni per normalizzare le concentrazioni di IPA il peso secco delle foglie e/o l'area fogliare, parametri anche meno soggetti all'incertezza sperimentale.

Accumulo di IPA in funzione dell'età delle foglie

Le concentrazioni di IPA, riferite sia al contenuto in lipidi che al peso secco delle foglie di leccio, non sono risultate statisticamente differenti in foglie di diversa età.

I valori, riferiti al contenuto in lipidi, variano tra 28 e 695, tra 12 e 647 e tra 13 e 625 ng/mg di lipidi, rispettivamente per foglie di 1, 2 e 3 anni. Per le foglie di due anni dei siti CTO, MT, VC e FF, i valori di concentrazione di IPA, molto più alti che nelle foglie delle altre due classi di età (Fig. 7.1 a), non denotano un effettivo maggiore accumulo, in quanto sono dovuti a valori particolarmente bassi del contenuto in lipidi misurati nelle foglie per questa classe di età (Tab. 7.1).

Le concentrazioni di IPA riferite al peso secco, in foglie di leccio di 1, 2 e 3 anni, non hanno evidenziato un particolare trend di accumulo in funzione dell'età. Per alcuni siti sono state evidenziate concentrazioni crescenti nelle foglie di 2 e poi di 3 anni. Le differenze più evidenti tra classi di età sono quelle relative al sito PL con valori di concentrazione nelle foglie di 2 e 3 anni rispettivamente di circa 1,2 e 1,4 volte superiori rispetto alle foglie di 1 anno, e al sito FF, con valori di concentrazione nelle foglie di 2 e 3 anni rispettivamente di circa 1,4 e 1,6 volte superiori rispetto alle foglie di 1 anno (Fig. 7.1 b).

Diversamente da quanto riscontrato per le foglie di leccio, altri studi in letteratura hanno evidenziato invece che l'età della foglia può influenzare l'accumulo degli inquinanti atmosferici (Prügel et al., 1994; Jetter et al., 1996). L'età della foglia sembra influenzare l'accumulo di IPA non sempre nella stessa direzione, infatti Tao et al., (2006) hanno determinato nelle foglie di riso più mature, cresciute in un'area contaminata, una minore concentrazione di IPA rispetto a foglie all'inizio del loro stadio di crescita. D'altra parte

Lehndorff & Schwark (2004) in uno studio condotto in Germania su *Pinus nigra*, hanno misurato concentrazioni di IPA, rispettivamente in aghi di uno e due anni di età, di 60 e 80 ng/g p.s., nel periodo estivo, e di circa 100 e 150-200 ng/g p.s., nel periodo invernale, quando, per fenomeni di condensazione, la concentrazione di IPA nelle foglie tende ad aumentare.

La mancanza di una relazione tra l'età delle foglie di leccio e il contenuto di IPA può essere spiegata considerando che l'accumulo di questi inquinanti non è unicamente funzione del tempo di esposizione delle foglie alla deposizione atmosferica, ma anche dei processi a cui gli IPA sono sottoposti una volta intrappolati nella vegetazione, quali fenomeni di fotodegradazione (Wild et al., 2005), che risultano pertanto un importante meccanismo di perdita di IPA

Il contenuto di IPA nella vegetazione è influenzato dall'assorbimento nei compartimenti più interni della foglia, dalle perdite per rivolatizzazione e da fenomeni di fotodegradazione che compensano la continua deposizione atmosferica di questi inquinanti nel tempo (Lehndorff & Schwark, 2004; Wild et al., 2004, 2005, 2006).

Siti	VS	VF	BA	PO	VM	PL	CTO	TG	VMD	VA	PT	PM	VCM	MT	AI	ASU	VC	ME	TO	AS	FF
Lipidi (mg/g p.s.)																					
1 anno	17,6	14,5	20,5	15,7	10,7	11,7	14,2	12,1	20,7	11,2	16,2	14,1	13,0	12,3	11,1	14,0	13,7	12,0	11,7	11,2	10,9
	(2,2)	(0,5)	(0,3)	(1,1)	(1,0)	(0,6)	(1,4)	(1,1)	(0,9)	(0,7)	(1,7)	(2,0)	(1,5)	(1,3)	(2,7)	(2,2)	(0,4)	(1,1)	(2,9)	(3,1)	(2,1)
2 anni	23,1	11,4	20,4	17,8	12,6	9,1	4,4	15,5	22,1	11,2	12,9	11,3	12,6	4,7	12,4	15,1	10,1	15,5	13,9	11,0	8,0
	(0,9)	(1,6)	(1,7)	(0,8)	(1,1)	(0,8)	(0,4)	(0,8)	(0,3)	(1,4)	(1,6)	(1,8)	(1,3)	(2,0)	(1,5)	(2,7)	(0,6)	(0,1)	(2,3)	(0,5)	(2,7)
3 anni	24,4	17,1	27,6	22,5	12,6	11,8	15,6	21,3	16,7	16,5	16,2	11,5	13,9	10,8	15,7	16,5	12,5	12,4	12,1	12,5	14,6
	(0,0)	(2,8)	(1,7)	(1,7)	(1,1)	(1,9)	(1,8)	(0,9)	(0,3)	(0,9)	(0,1)	(1,7)	(1,4)	(0,0)	(0,9)	(1,3)	(3,0)	(3,2)	(1,0)	(1,3)	(1,2)
Ps/Pf%																					
1 anno	62,1	56,1	63,4	57,7	56,9	56,6	56,9	62,8	60,3	56,4	57,0	59,9	56,5	57,7	55,7	56,8	56,8	57,5	54,9	58,6	59,9
	(0,2)	(0,5)	(0,9)	(0,2)	(1,1)	(0,1)	(0,2)	(0,8)	(1,9)	(0,4)	(0,6)	(0,3)	(0,6)	(0,4)	(0,3)	(0,2)	(0,2)	(0,2)	(0,2)	(0,2)	(1,5)
2 anni	62,9	58,6	63,0	58,1	56,1	58,0	59,1	60,2	59,9	56,8	56,4	61,2	58,5	57,1	57,7	58,1	57,3	58,6	55,2	60,0	61,0
	(0,8)	(0,8)	(0,1)	(0,3)	(1,4)	(0,1)	(0,9)	(0,3)	(0,1)	(0,3)	(0,4)	(0,8)	(0,5)	(0,2)	(0,4)	(0,5)	(0,0)	(0,2)	(0,2)	(0,8)	(0,2)
3 anni	62,4	59,4	63,5	58,9	56,9	57,5	59,0	61,4	63,7	57,2	58,7	59,6	58,1	56,9	57,9	59,1	57,9	58,4	57,0	59,1	60,3
	(0,1)	(1,6)	(0,7)	(1,2)	(1,2)	(0,1)	(0,4)	(0,2)	(0,6)	(0,6)	(2,0)	(0,8)	(0,6)	(0,0)	(0,4)	(0,4)	(0,3)	(0,3)	(0,2)	(0,2)	(0,6)

Tabella 7.1 Contenuto lipidico (\pm e.s.) e rapporto percentuale Ps/Pf (\pm e.s.), per le foglie di *Quercus ilex* di tre generazioni (1, 2 e 3 anni) prelevate da 21 siti delle province di Napoli e Salerno.

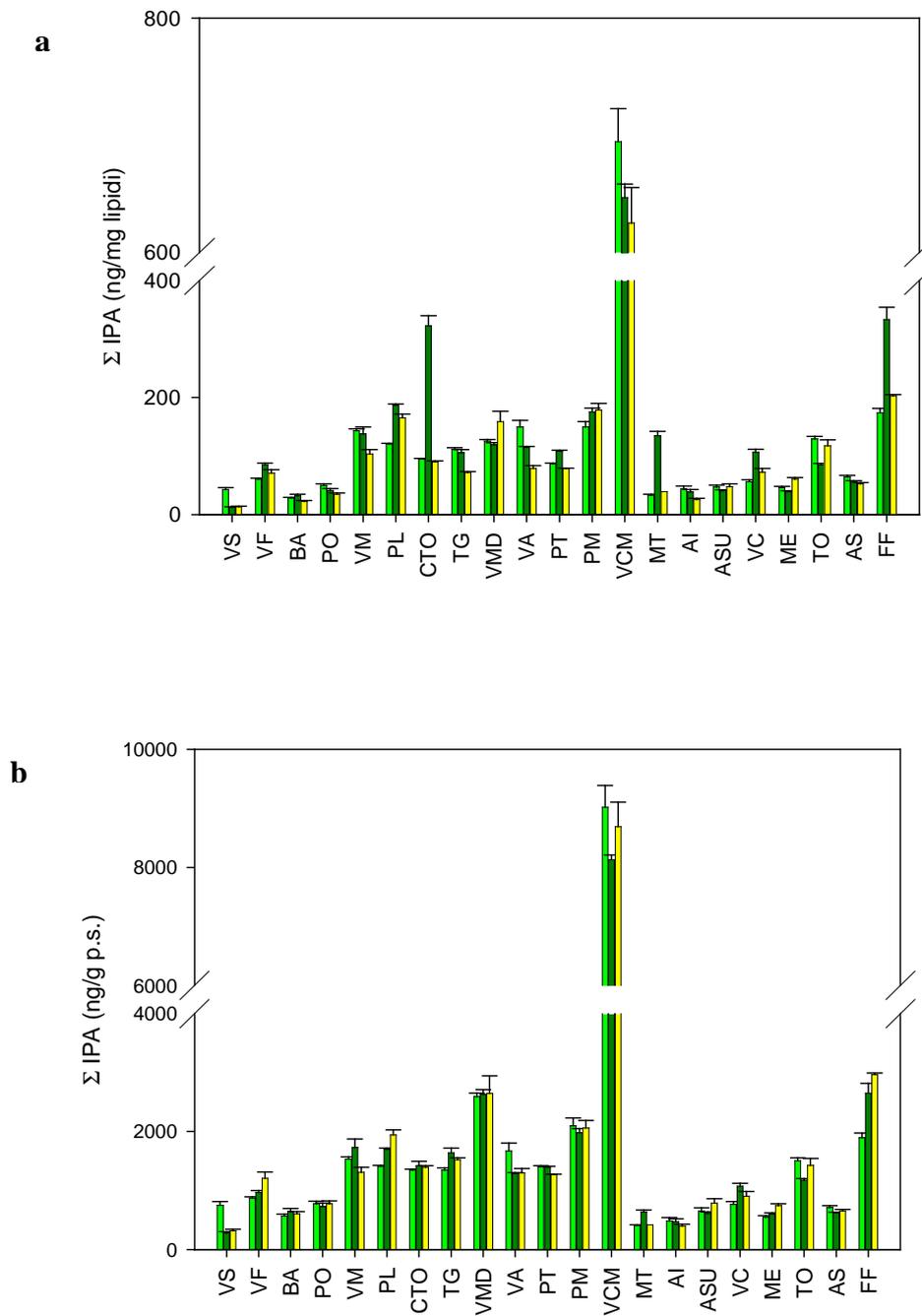


Figura 7.1 Contenuto totale di IPA (\pm e.s.) espresso come ng/mg di lipidi (a) e come ng/g p.s. (b) in foglie di *Q. ilex* di 1, 2 e 3 anni nei 21 siti analizzati.

7.2 Gradienti spaziali di contaminazione e profilo degli IPA

La concentrazione degli IPA totali, mediata tra le tre classi di età, varia tra 449 e 487 ng/g p.s. nelle foglie di leccio di aree remote e tra 609 e 8612 ng/g p.s. nelle foglie di leccio di siti a carattere urbano e industriale. Le foglie campionate in una zona interna di una lecceta dell'area periurbana di Salerno (AI), hanno mostrato valori medi di concentrazione (453 ng/g p.s.) confrontabili con quelli misurati nelle foglie dei siti remoti (VS e MT), utilizzati come controllo. Le più alte concentrazioni di IPA (8612 ng/g p.s) sono state invece misurate nelle foglie campionate in un sito dell'area urbana di Napoli, interessato dalla confluenza di più strade ad elevato flusso di traffico (VCM), e nelle foglie prelevate da un sito interessato dall'attività di una fonderia (FF) nell'area urbana di Salerno, con valori di circa 2505 ng/g p.s (Fig. 7.2).

Il contenuto di IPA nelle foglie di leccio di alcuni siti studiati risulta confrontabile con quello misurato in un precedente studio di biomonitoraggio negli stessi siti (De Nicola et al., in press).

I valori di IPA totali misurati nelle foglie provenienti dalle aree remote del Vesuvio e del Monte Tubenna sono confrontabili con quelli rinvenuti da Wagrowski e Hites (1997) in aghi di *Pinus strobus* situati in zone rurali degli Stati Uniti (370 ng/g p.s.) e più alti di quelli riscontrati da Müller e collaboratori (2001) in foglie di *Melaleuca leucadendra*, una specie arborea sempreverde australiana, in un'area in prossimità di una riserva forestale (180-240 ng/g p.s.).

Le concentrazioni misurate nelle foglie di leccio prelevate in alcuni siti urbani (VMD e PM), rientrano nel range di concentrazioni di IPA (2100-2600 ng/g p.s.) misurato in foglie di alberi lungo una strada ad elevato traffico veicolare (Müller et al., 2001). Le concentrazioni di IPA misurate nelle foglie di leccio campionate nel sito urbano-industriale FF, di 2500 ng/g p.s., risulta inferiore rispetto a quelle determinate in aghi di pino di due siti industriali con produzione di combustibili a gas e a carbone nella Repubblica Ceca (Holoubek et al., 2000). L'influenza della tipologia di sito sull'accumulo di IPA nelle foglie è stata evidenziata anche da Lehndorff e Schwark (2004) in uno studio di biomonitoraggio in diversi siti in Germania, con i più alti valori

di IPA totali riscontrati nei campioni prelevati nelle strade maggiormente trafficate rispetto a quelli prelevati in parchi urbani e suburbani.

Non sempre i livelli di contaminazione da IPA in atmosfera riflettono la tipologia di sito: l'analisi delle deposizioni atmosferiche in aree rurali della Korea, ad esempio, ha evidenziato che i livelli di contaminazione atmosferica da IPA sono attribuibili sia alle emissioni locali che a fonti di emissione localizzate in aree urbane più lontane (Bae et al., 2002).

In questa ricerca i campionamenti sono stati tutti effettuati in marzo, alla fine del periodo invernale. Come è stato dimostrato in diversi studi, il periodo invernale risulta quello in cui si registrano le più consistenti emissioni di IPA, per cui il bioaccumulo nelle foglie di leccio risulta più importante proprio in questi mesi. La presenza degli IPA in atmosfera infatti, cambia notevolmente non solo in base alla tipologia di sito e alla vicinanza o meno a fonti di emissione, ma anche in base alla stagione. Ad esempio, le concentrazioni di IPA in foglie mature di leccio campionate nell'area urbana di Napoli nei mesi invernali hanno mostrato valori circa 4 volte più alti rispetto a quelli misurati in foglie campionate nei mesi estivi (De Nicola et al., 2005), in accordo con i gradienti temporali di contaminazione rilevati in atmosfera nella stessa area (Caricchia et al., 1999).

Per l'analisi dei gradienti spaziali di contaminazione da IPA sono stati utilizzati i dati di concentrazione riferiti al peso secco delle foglie; bisogna comunque mettere in evidenza che il trend fra i siti studiati è simile se si confronta con quello ottenuto con i dati riferiti al contenuto lipidico delle foglie (Fig. 7.1).

L'analisi delle foglie di leccio è apparsa dunque estremamente valida al fine del monitoraggio dei gradienti spaziali di contaminazione da IPA, anche alla luce del confronto con risultati di precedenti ricerche nelle stesse aree (Alfani et al., 2001; De Nicola et al., in press). I trend di concentrazione di IPA si sono ripetuti a distanza di anni, sebbene i valori assoluti siano cambiati.

Il profilo degli IPA, come contributo percentuale del singolo composto al totale, permette di rilevare eventuali fonti comuni di emissione di IPA nei diversi siti di campionamento (Fig. 7.3).

Nei siti controllo si rileva una maggiore presenza di IPA a basso peso molecolare, in particolare naftalene (36,02%) e acenaftilene (19,82%), a due anelli aromatici, e, in minore percentuale, fenantrene e fluorantene (10,15 e 9,42% rispettivamente) a tre anelli benzenici. Gli IPA a due e tre anelli di condensazione si trovano in atmosfera in forma gassosa e la loro dispersione può interessare aree remote lontane dalla fonte di emissione (Yang et al., 1991). Emissioni biogeniche di naftalene e acenaftilene sono state inoltre evidenziate da alcuni autori (Krauss et al., 2005) nelle foreste tropicali, e attribuite al metabolismo microbico di comunità di saprotrofi epifiti. Le basse percentuali di IPA ad elevato peso molecolare nelle foglie di leccio delle aree remote del Vesuvio e del Monte Tubenna, concordano con quanto evidenziato da Wagrowski e Hites, (1997) in foglie di mais, acero e pino: tali autori attribuiscono le basse concentrazioni di questi idrocarburi nelle foglie, alla loro degradazione in atmosfera o sulla vegetazione, oltre che alla loro deposizione in differenti *sink* dell'ambiente. Nelle foglie di leccio dei siti controllo l'unico idrocarburo ad alto peso molecolare, rinvenuto con una percentuale rilevante (9,04%), 12 volte superiore alla percentuale misurata nelle foglie dei siti urbani e industriali, è il dibenzo(a,h)antracene, idrocarburo cancerogeno a 5 anelli aromatici. Le aree remote investigate sono stagionalmente interessate da incendi boschivi che potrebbero essere la fonte di questo idrocarburo. Esperimenti per provare il rilascio di IPA in seguito a incendi di biomassa, sono stati effettuati da Muraleedharan e collaboratori (2000). Tali autori bruciando campioni di torba alle temperature tipiche delle combustioni naturali (500-600 °C), hanno riscontrato la presenza di CO₂, CO e CH₄ ma non di IPA. La presenza di alcuni IPA in atmosfera dopo incendi di foreste, potrebbe essere dovuta, comunque, a reazioni atmosferiche tra sostanze primarie emesse dagli incendi (Lobert & Warnatz, 1993).

I composti maggiormente presenti nelle foglie di leccio campionate nelle aree urbane sono quelli a tre anelli, quali fluorantene (19,3%) e fenantrene (17,0%) e a quattro anelli, come pirene (21,7%) e crisene (8,4%), in accordo con quanto evidenziato da diversi autori in studi di biomonitoraggio (Alfani et al., 2001; Muller et al., 2001; Gerdol et al., 2002). Anche nelle foglie dei siti industriali (BA e FF), i composti che danno il maggiore contributo percentuale alla concentrazione totale di IPA sono fenantrene (mediamente 18,1%), fluorantene (20,83%) e pirene (20,21%). Nelle aree

industriali elevate concentrazioni di pirene in atmosfera sono state attribuite alla combustione di oli (Kulkarni et al., 2000). Lehndorff & Schwark (2004) hanno identificato fenantrene, fluorante e pirene come gli idrocarburi maggiormente presenti negli aghi di pini situati in aree urbane e industriali in Germania, attribuendo questa predominanza al fatto che gli IPA semivolatili a medio peso molecolare sono quelli emessi principalmente dal traffico veicolare. Wagrowski e Hites, (1997) hanno rilevato in campioni di foglie provenienti da aree rurali, urbane e suburbane, sempre una maggiore presenza di fenantrene, fluorantene e pirene rispetto a tutti gli altri IPA monitorati.

Il profilo degli IPA può variare in specie diverse pur essendo queste esposte alle stesse fonti di emissione. Infatti, come riscontrato da Howsam et al. (2001) in uno studio di biomonitoraggio di IPA in foglie di tre diverse specie decidue (quercia, frassino e noce) situate nella foresta di Meathop (Regno Unito), il profilo degli IPA varia a seconda della specie in esame. Un incremento di IPA a tre anelli nelle foglie di tutte e tre le specie è stato determinato dalla presenza in atmosfera di emissioni dovute principalmente a falò appiccati per una ricorrenza locale, mettendo ancora una volta in luce l'importanza dei fenomeni di combustione di biomasse nel rilascio degli IPA.

I dati ottenuti mostrano che, se la concentrazione totale di IPA nelle foglie di leccio evidenzia il grado di contaminazione, il profilo discrimina le diverse fonti che possono influenzare la presenza di IPA nell'aria.

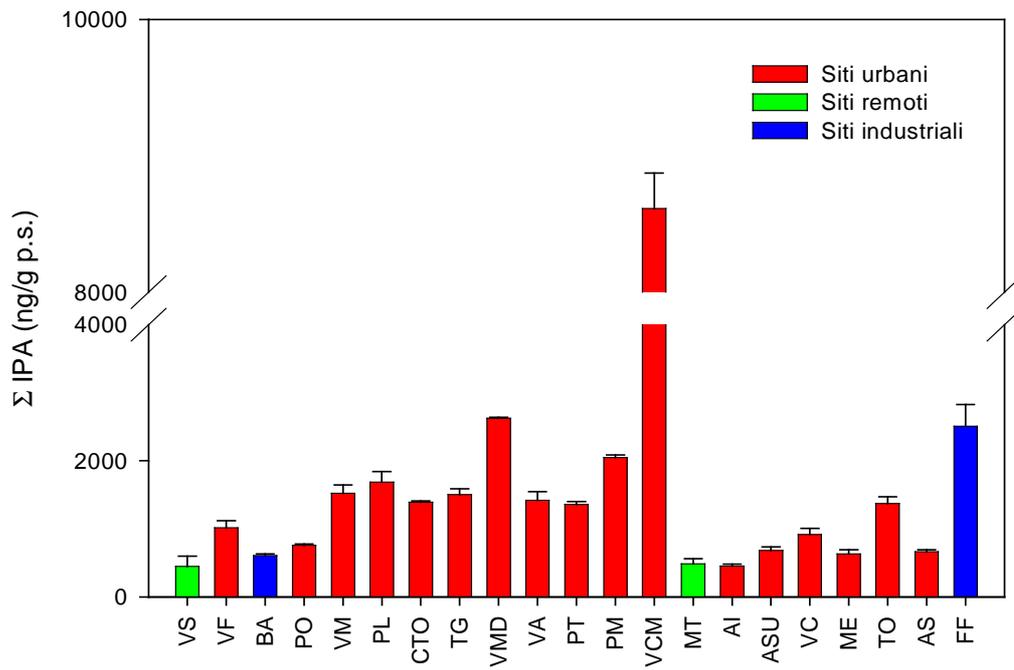


Figura 7.2 Concentrazioni medie (\pm e.s.) di IPA totali in foglie di *Q. ilex* di 3 classi di età (1, 2, 3 anni) di siti controllo, industriali e urbani di Napoli e Salerno.

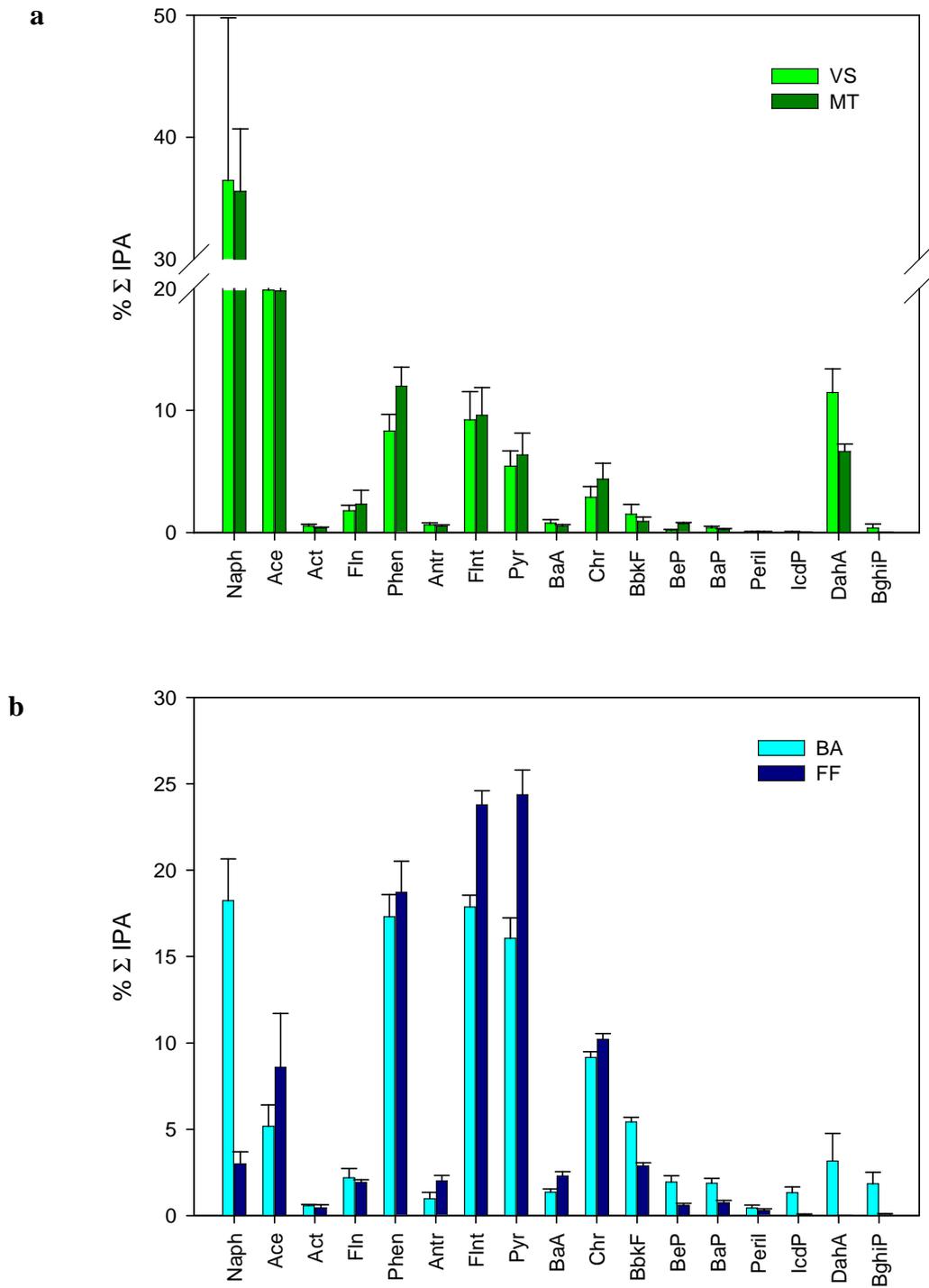


Figura 7.3 a e b Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale in foglie di *Q. ilex* di 3 classi di età (1, 2, 3 anni) di siti controllo (a) e industriali (b) di Napoli e Salerno.

c

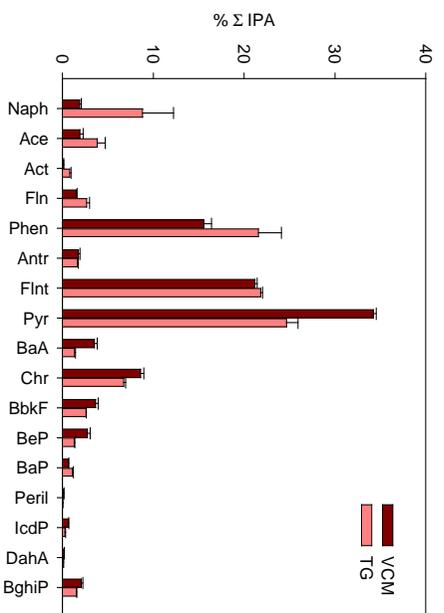
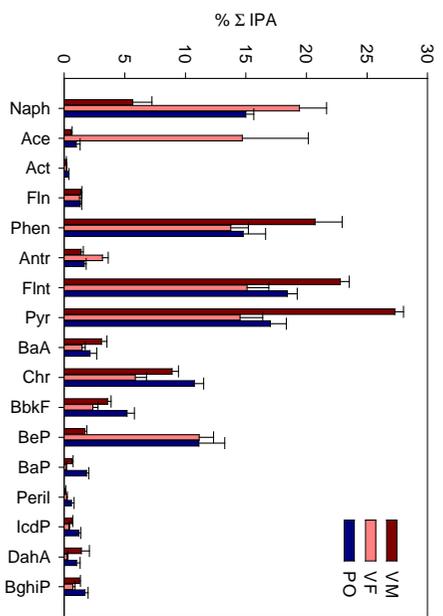
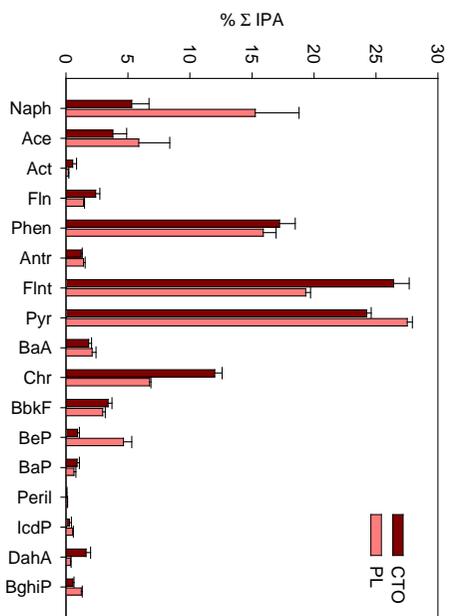
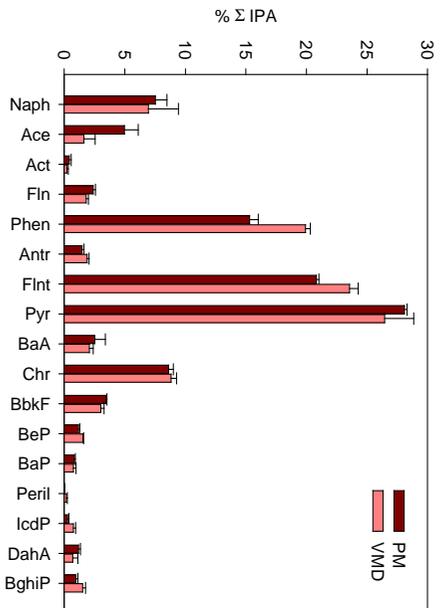
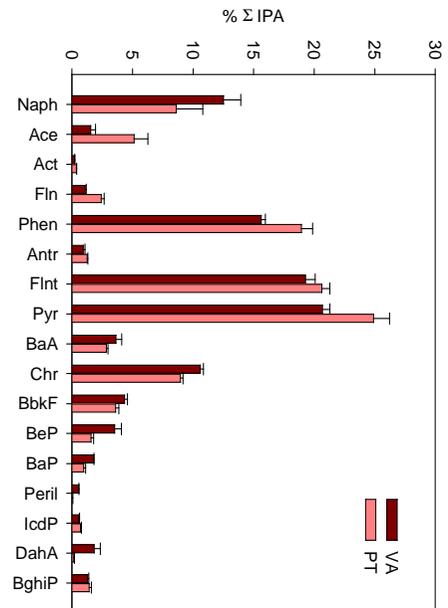


Figura 7.3 c Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale in foglie di *Q. ilex* di 3 classi di età (1, 2, 3 anni) di siti urbani di Napoli.

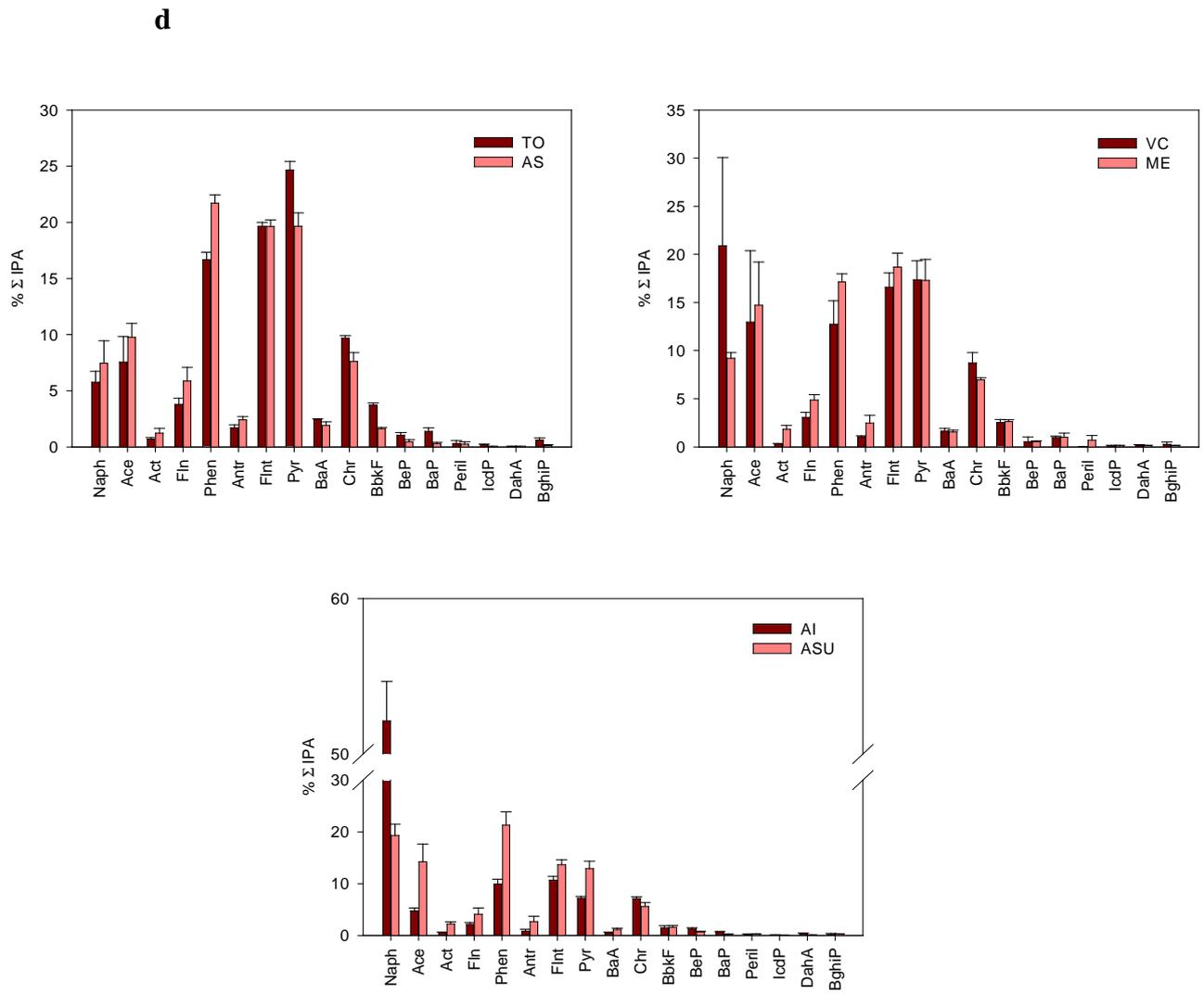


Figura 7.3 d Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale in foglie di *Q. ilex* di 3 classi di età (1, 2, 3 anni) di siti urbani di Salerno.

7.3 Variazione del contenuto di IPA nelle foglie senescenti di siti contaminati

Nel maggio 2006, in coincidenza col periodo di massima caduta delle foglie di leccio, per scuotimento degli alberi nei siti urbani PM, VMD, VCM e FF, sono state prelevate foglie senescenti, al fine di confrontare le concentrazioni degli IPA in queste ultime con quelle rilevate precedentemente nelle foglie verdi. Per tutti e quattro i siti analizzati si è riscontrata una diminuzione degli IPA totali nelle foglie senescenti rispetto alle verdi, di circa il 70% per i siti VMD e FF e del 46 e 49% rispettivamente per i siti PM e VCM (Tab. 7.2).

Per verificare un eventuale diverso andamento degli IPA con caratteristiche fisiche e chimiche diverse, sono stati confrontati gli IPA a basso (LMW), a medio (MMW), e ad alto (HMW) peso molecolare, secondo la classificazione di Harner & Bidleman (1988), (Fig. 7.4 a).

Rispetto alle foglie verdi, nelle foglie senescenti gli LMW decrementano del 75% nei siti PM e VMD, e del 69% nei siti VCM e FF.

Gli MMW decrementano di circa il 73% nei siti VMD e FF, e del 42 e 52% rispettivamente nei siti PM e VCM.

Gli HMW sono risultati, rispetto ai LMW e ai MMW, gli IPA che hanno subito un minor decremento nelle foglie senescenti rispetto alle foglie verdi (Fig. 7.4 a). Il decremento è stato particolarmente contenuto nei siti PM (27%), VCM (12%) e pari al 37% e al 47% rispettivamente nei siti FF e VMD.

Le percentuali della maggior parte degli IPA a basso peso molecolare (naftalene, acenaftilene, acenaftene e fluorene) e degli IPA a medio peso molecolare (fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene e crisene), per tutti e quattro i siti analizzati, tendono per lo più a diminuire o a rimanere costanti durante il processo di senescenza delle foglie (Fig. 7.4 b).

Tra gli IPA a basso peso molecolare, il fluorene non subisce grosse variazioni nelle foglie dei siti PM e VCM, mentre nei siti VMD e FF aumenta di circa 2,6 volte.

Tra gli IPA a medio peso molecolare, nei siti urbani si nota un incremento quasi doppio del pirene (PM) e del crisene (VMD, VCM), mentre nel sito industriale (FF) la percentuale di tali idrocarburi resta per lo più invariata (Fig. 7.4 b).

Gli IPA ad alto peso molecolare (benzo(b+k)fluorantene, benzo(e)pirene, benzo(a)pirene, perilene, indeno(1,2,3,c-d pirene), dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene) invece, tendono ad aumentare in rapporto percentuale nelle foglie senescenti rispetto alle foglie verdi in tutti e quattro i siti analizzati (Fig. 7.4 b).

Gli IPA a basso e medio peso risultano essere verosimilmente molecole più facilmente decomponibili rispetto agli IPA ad alto peso (Juhasz & Naidu, 2000; Howsam et al., 2001; Ambrosoli et al., 2005).

La crescita di alcuni microrganismi sulle foglie, come i funghi, avviene prima che queste, ormai senescenti, cadano e raggiungano il suolo (Berg & McClaugherty, 2003). Alcune specie di funghi filamentosi sono in grado di utilizzare come fonte di carbonio gli IPA accumulati in foglie di specie decidue (Jouraeva et al, 2006).

Ciò può indurre ad ipotizzare che il decremento percentuale degli IPA più leggeri nelle foglie senescenti rispetto alle foglie verdi sia dovuto all'azione di microrganismi in grado di degradare tali idrocarburi, mentre l'incremento percentuale degli IPA ad alto peso molecolare potrebbe essere imputato al fatto che questi idrocarburi più pesanti e lipofili sono meno biodisponibili e dunque meno soggetti alla biodegradazione.

	PM	VMD	VCM	FF
	Σ IPA (ng/g p.s.)			
Foglie verdi	2062,84±126,08	2646,67±298,08	8686,93±420,47	2966,05±28,02
Foglie senescenti	1111,59±58,19	792,39±65,53	4428,54±442,77	896,45±38,98

Tabella 7.2 Concentrazione di IPA totali (\pm e.s.) in foglie di leccio verdi (3 anni) e senescenti, prelevate nei siti PM, VMD, VCM e FF.

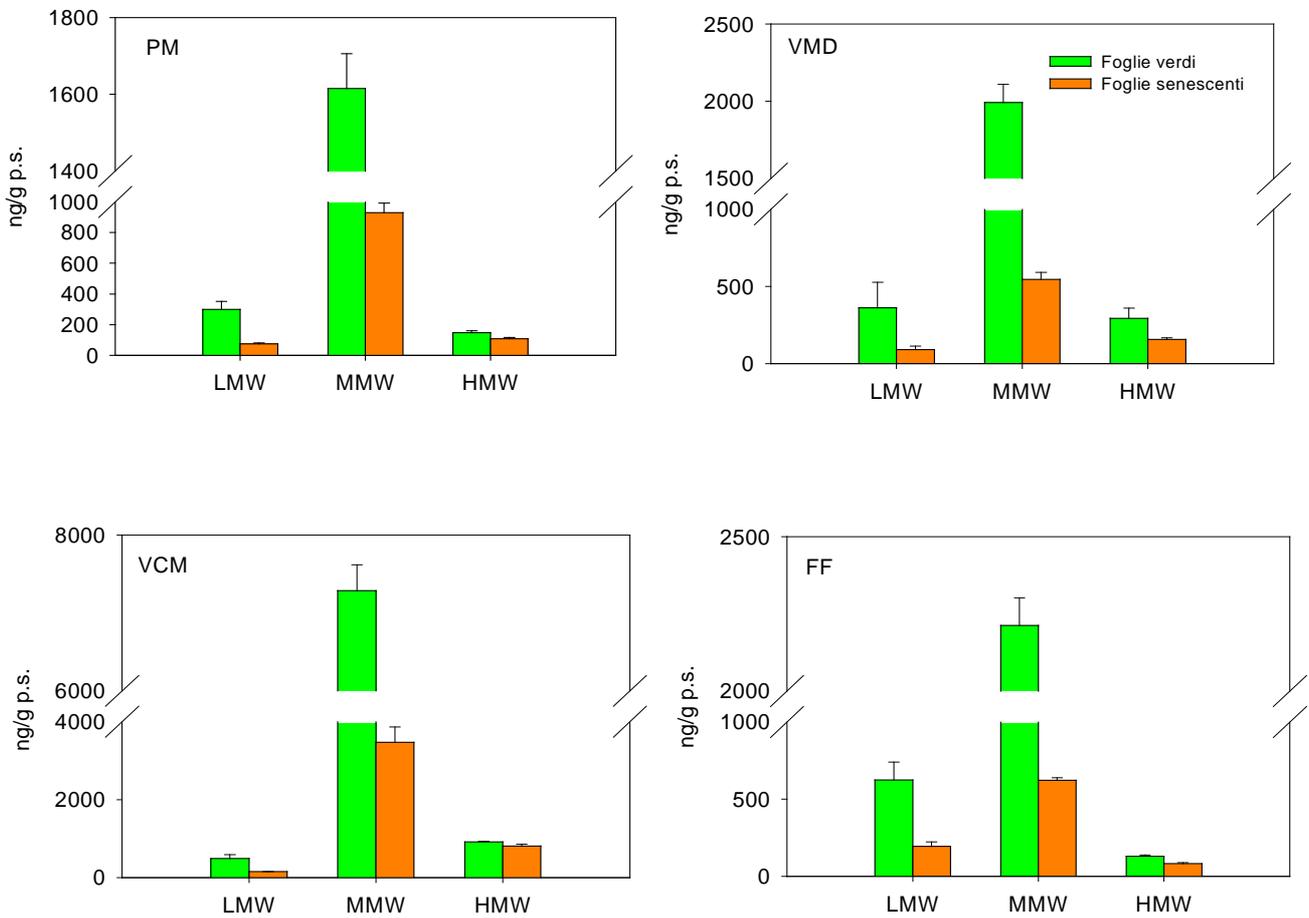


Figura 7.4 a Concentrazione media (\pm e.s.) di IPA a basso (LMW), medio (MMW) ed alto peso molecolare (HMW) in foglie di leccio verdi (3 anni) e senescenti, prelevate nei siti PM, VMD, VCM, FF.

LMW= Naph, Ace, Act, Fln;

MMW= Phen, Antr, Flnt, Pyr, BaA, Chr;

HMW= BbKF, BeP, BaP, Peril, IcdP, DahA, BghiP.

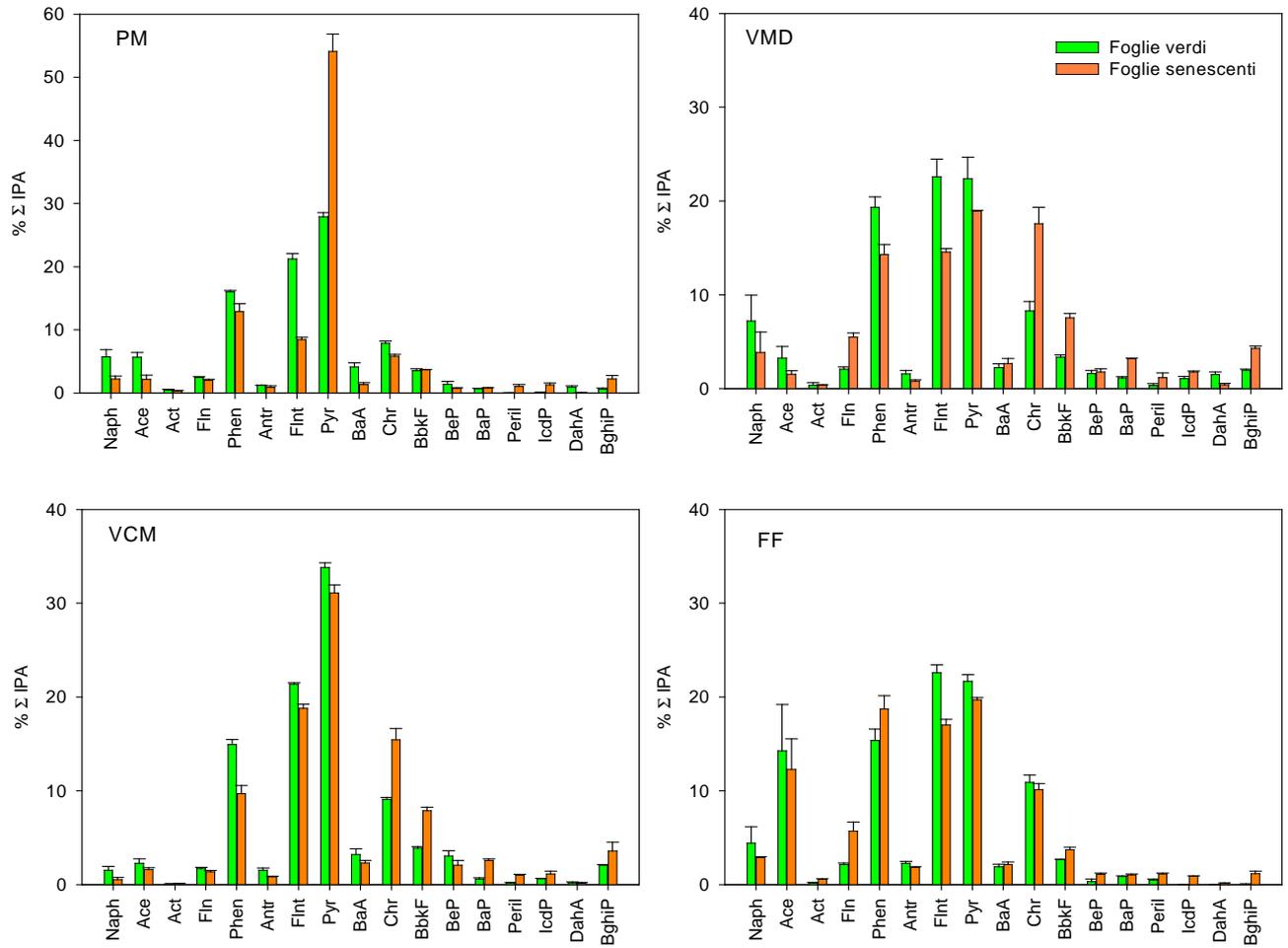


Figura 7.4 b Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale in foglie di *Q. ilex* verdi (3 anni) e senescenti prelevate nei siti urbani PM, VMD e VCM e nel sito industriale FF.

8. Dinamica della decomposizione della lettiera di foglie di leccio ad elevato contenuto di IPA

Il processo di decomposizione delle foglie di leccio, seguito col metodo delle *litter bags* in mesocosmi tenuti in condizioni controllate, mirava a valutare: 1) il tasso di decomposizione di foglie a diverso accumulo di IPA, e 2) la degradazione degli IPA parallelamente alla decomposizione delle foglie.

Le foglie sono state incubate dopo un periodo di stabilizzazione all'aria per portarle ad un contenuto stabile di acqua, in equilibrio con l'umidità ambientale.

8.1 Analisi degli IPA in foglie dopo stabilizzazione all'aria

L'analisi del contenuto di IPA nelle foglie di leccio provenienti da un sito remoto (VS), da uno urbano (PM) e da uno industriale (FF), prima e dopo i due mesi di stabilizzazione all'aria, ha messo in luce per tutti e tre i siti analizzati una diminuzione degli IPA totali nelle foglie stabilizzate rispetto alle foglie verdi (Tab. 8.1). Le foglie verdi dei siti PM e FF mostravano un contenuto di IPA totali di un ordine di grandezza maggiore rispetto alle foglie del sito VS. I risultati ottenuti evidenziano un decremento del 59, del 15 e del 47% circa degli IPA totali rispettivamente nelle foglie del sito VS, PM e FF dopo il periodo di stabilizzazione

Suddividendo gli IPA in funzione del loro peso molecolare in IPA a basso (LMW), a medio (MMW), ed ad alto peso molecolare (HMW), è stato possibile verificare che, per tutti e tre i siti analizzati, il maggior decremento di IPA dopo la stabilizzazione (88, 84, e 78%, rispettivamente per VS, PM e FF), interessa i LMW (Fig. 8.1 a).

Nelle foglie provenienti dai siti remoto (VS) e industriale (FF), gli MMW decrementano del 24 e 39% e gli HMW del 55 e 45% rispettivamente; nelle foglie del sito urbano (PM) non si notano invece rilevanti variazioni (Fig. 8.1 a).

Il profilo degli IPA come contributo percentuale del singolo al totale (Fig. 8.1 b) mette in evidenza il diverso rapporto percentuale tra gli IPA nelle foglie provenienti dai tre siti prima e dopo la stabilizzazione all'aria.

Per tutti e tre i siti analizzati, dopo la stabilizzazione si nota un forte decremento percentuale dell'acenaftilene e un contemporaneo incremento di fenantrene, fluorantene e pirene, mentre gli IPA a maggiore peso molecolare non subiscono grosse variazioni (Fig. 8.1 b). Le concentrazioni in valore assoluto dell'acenaftilene decrementano infatti, dopo la stabilizzazione, del 96, 91 e 84%, rispettivamente nelle foglie di VS, PM e FF. La maggiore volatilità dell'acenaftilene può spiegare il suo decremento nelle foglie di leccio per la sola esposizione all'aria. Gli IPA a basso peso molecolare sono infatti più facilmente soggetti a "perdite" abiotiche, in particolar modo dovute alla rivolatilizzazione (Lehndorff & Schwark, 2004). Non è comunque da escludere, già in questa fase, l'effetto della decomposizione biologica attribuibile a funghi filamentosi in grado di utilizzare come fonte di carbonio gli IPA accumulati nelle foglie (Jouraeva et al, 2006).

	<i>Sito remoto (VS)</i>	<i>Sito urbano (PM)</i>	<i>Sito industriale (FF)</i>
	Σ IPA (ng/g p.s.)		
<i>Foglie verdi</i>	156,16 ±10,11	1019,18 ±69,00	1207,94 ±35,60
<i>Foglie stabilizzate</i>	63,92 ±1,99	868,18 ±74,21	644,10 ±8,61

Tabella 8.1 Concentrazione di IPA totali (\pm e.s.) in foglie di leccio prelevate nei siti VS, PM e FF, prima e dopo la stabilizzazione all'aria.

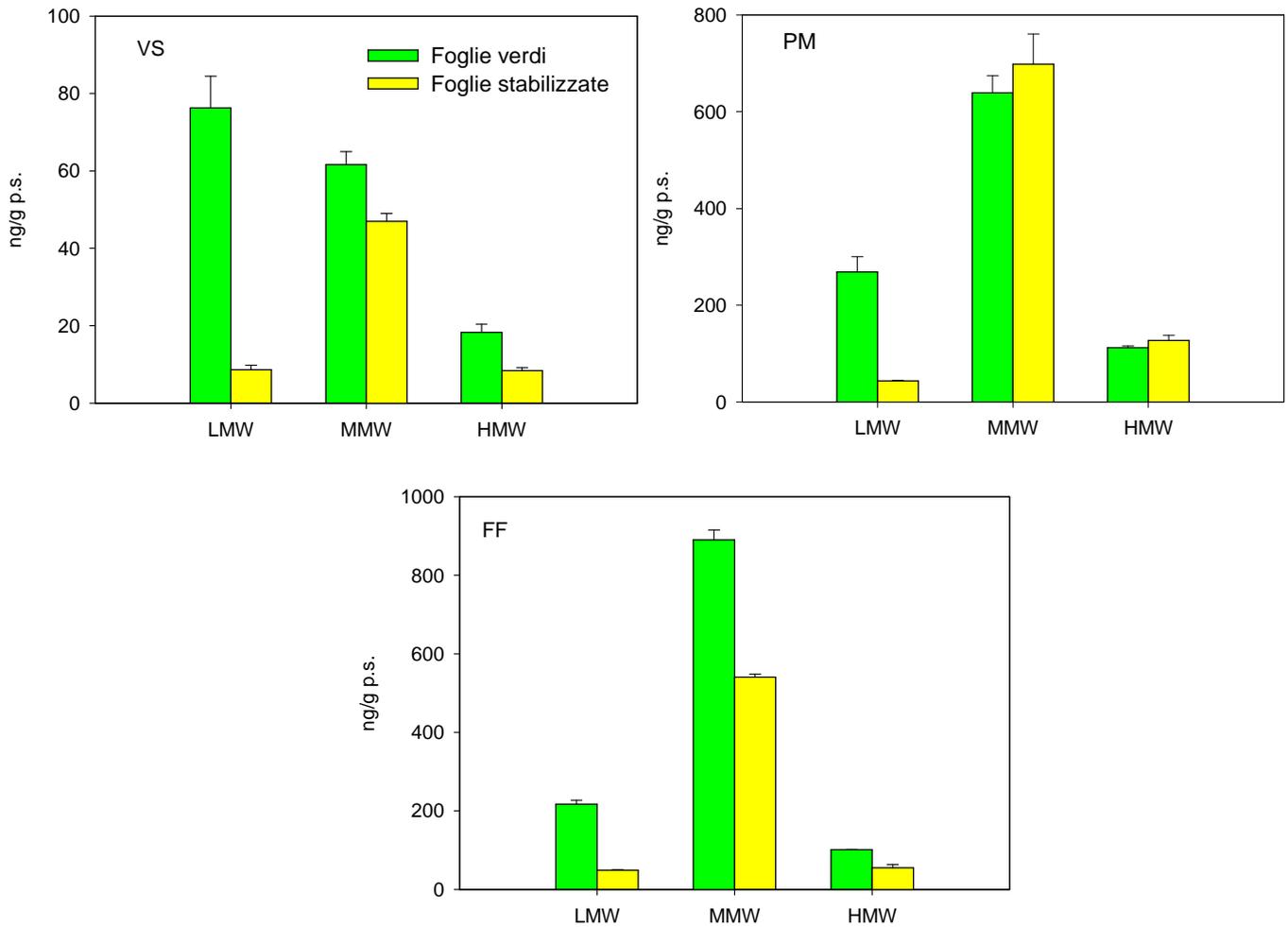


Figura 8.1 a Concentrazione media (\pm e.s.) di IPA a basso (LMW), medio (MMW) ed alto peso molecolare (HMW) in foglie di leccio verdi e stabilizzate all'aria, prelevate nei siti VS, PM e FF.

LMW= Ace, Act, Fln;

MMW= Phen, Antr, Flnt, Pyr, BaA, Chr;

HMW= BbKF, BeP, BaP, Peril, IcdP, DahA, BghiP.

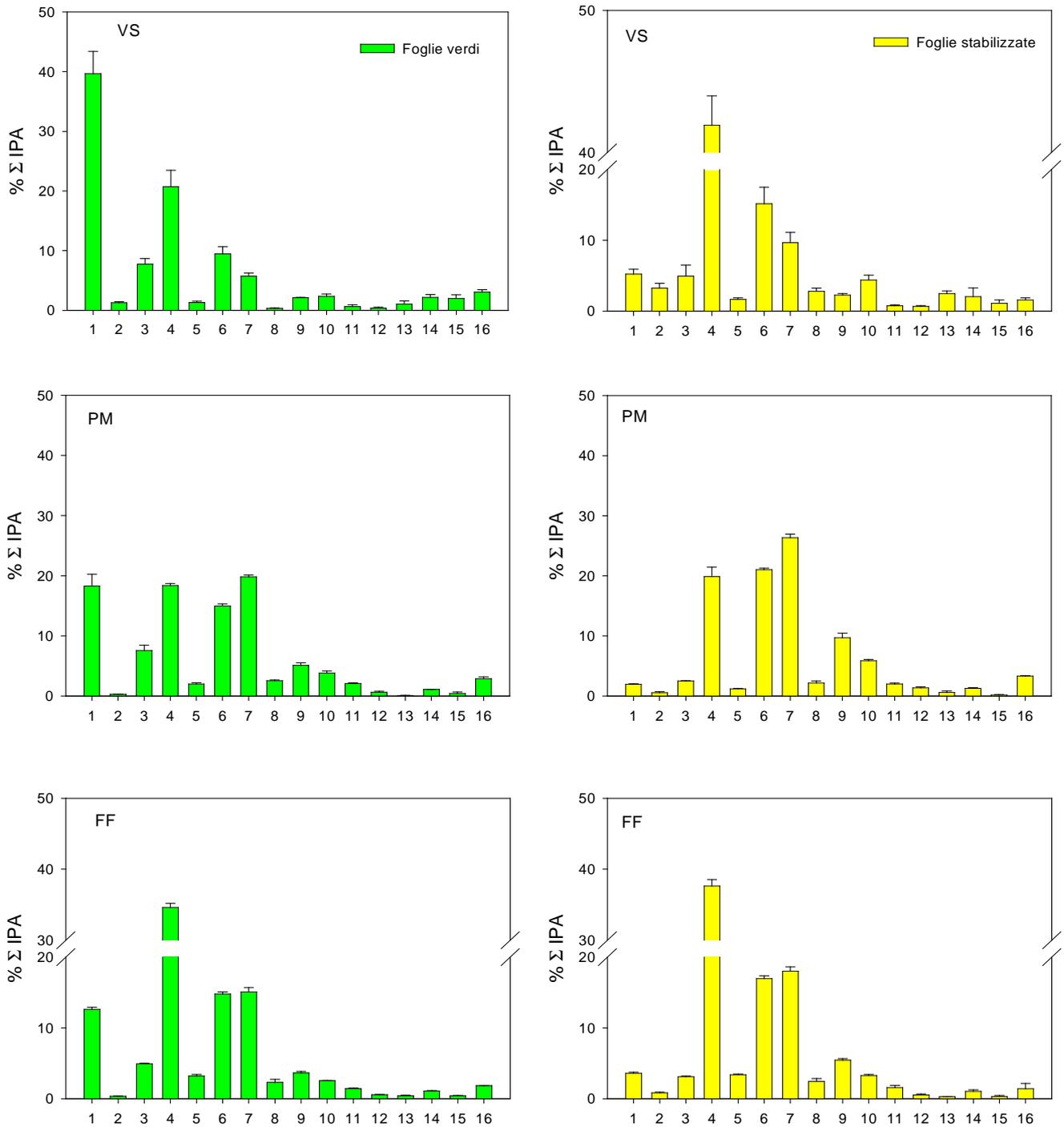


Figura 8.1 b Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale in foglie di leccio verdi e stabilizzate all'aria, prelevate nei siti VS, PM e FF. (1=Ace, 2=Act, 3=Fln, 4=Phen, 5=Antr, 6=Flnt, 7=Pyr, 8=BaA, 9=Chr 10=BbKF, 11=BeP, 12=BaP, 13=Peril, 14=IcdP, 15=DahA, 16=BghiP).

8.2 Decomposizione della lettiera di foglie

Dopo 39, 105, 177, 246, 303 e 361 giorni di incubazione, in condizioni controllate di umidità e temperatura, sono stati prelevati dai mesocosmi sacchetti di lettiera per ogni sito per la determinazione della perdita di peso.

I dati relativi alla decomposizione delle lettiere di foglie provenienti dai siti remoto (VS), urbano (PM), e industriale (FF) (Tab. 8.2 e Fig. 8.2), non mostrano differenze statisticamente significative di perdita di peso durante il periodo di osservazione. Il trend di decomposizione delle lettiere provenienti dalle tre diverse tipologie di siti è risultato simile, in accordo con quanto riscontrato da Carreiro et al. (1999) in uno studio sulla decomposizione della lettiera di foglie di quercia rossa lungo un gradiente urbano-rurale a New York.

La lettiera di foglie di leccio prelevate nel sito urbano (PM) è quella che si decompone maggiormente, infatti perde il 14% di peso al primo prelievo dopo circa un mese, il 27% dopo due, il 57% dopo sei e il 67% dopo otto mesi, valore sul quale si assesta anche nei mesi successivi (Fig. 8.2).

Le foglie del sito remoto (VS) sono quelle che invece si decompongono in misura minore: infatti perdono l'11% di peso al primo prelievo dopo circa un mese, il 22% dopo due, il 46% dopo sei e il 64% dopo otto mesi.

Le foglie del sito industriale (FF), che inizialmente perdono meno peso (10%) rispetto alle altre lettiere, già al secondo prelievo perdono peso in misura simile alle foglie del sito urbano (28%), perdendo poi dopo sei mesi il 49% e dopo otto mesi il 60% circa del peso iniziale e mostrando valori pressoché invariati anche nei tempi successivi (Fig. 8.2). In tabella 8.2 sono riportati i tassi di decomposizione delle tre lettiere di foglie nel periodo 0-246 giorni di osservazione. Non sono riportati i dati per il successivo periodo perché non appare evidente un'ulteriore perdita di peso delle lettiere del sito urbano e industriale, e non sono stati rilevati dati per il sito remoto. La lettiera del sito urbano è quella che mostra il più alto tasso medio di decomposizione (Tab. 8.2).

I dati ottenuti sono in disaccordo con quanto riscontrato in altri studi in cui, durante il processo di decomposizione, lettiere di foglie provenienti da aree remote perdevano peso in misura maggiore rispetto a quelle di siti a maggiore impatto antropico (Carreiro

et al., 1999; Pavao-Zuckerman & Coleman, 2005). Alla maggiore presenza di inquinanti nelle foglie di siti urbani e industriali, che alterano la composizione chimica delle foglie, veniva attribuito il più basso tasso di decomposizione.

La più alta velocità di decomposizione misurata per la lettiera di foglie di leccio del sito urbano ha trovato anche riscontro nella cospicua colonizzazione di ife fungine nella lettiera all'ultimo prelievo, dopo 361 giorni di incubazione (Fig 8.3). Pochi sono gli studi che hanno focalizzato l'attenzione sulla possibilità che inquinanti organici atmosferici influenzino il processo di decomposizione e la crescita di organismi decompositori, alterando le proprietà delle foglie che entrano poi a far parte del pool di detriti. In letteratura infatti sono noti principalmente studi relativi agli effetti dell'inquinamento urbano da metalli pesanti sulla decomposizione. Cotrufo et al., (1995), hanno messo in evidenza un significativo decremento della biomassa fungina sulla lettiera di siti urbani e del tasso di decomposizione di quest'ultima rispetto al controllo. Il tasso di decomposizione era correlato negativamente alla concentrazione di alcuni metalli pesanti nelle foglie prelevate nell'area urbana. Berg & McLaugherty, (2003), hanno messo in evidenza l'influenza dei metalli pesanti soprattutto sugli stadi più tardivi del processo di decomposizione, suggerendo che la decomposizione della lignina è "sensibile" alle alterazioni antropiche.

Differenze anche minime nella composizione chimica della lettiera, importanti per le comunità microbiche e che spesso non possono essere rilevate dalle analisi chimiche standard, possono portare a un diversa velocità di decomposizione (Carreiro et al., 1999).

In aree urbane così come in aree industriali le foglie sono influenzate oltre che da una maggiore presenza di inquinanti anche da diverse tipologie di inquinamento con effetti che possono essere sinergici o antagonisti sulle foglie e di conseguenza sul processo di decomposizione.

La decomposizione di foglie di leccio trattate sperimentalmente con elevate concentrazioni di ozono, è risultata più lenta di quella di foglie controllo (Alfani et al., dati non pubblicati), evidenziando un chiaro effetto negativo dell'ozono sulla velocità di decomposizione delle foglie.

Il più basso tasso di decomposizione rilevato in questo lavoro per le foglie del Vesuvio, che perdono, durante tutto il periodo di osservazione, meno peso a confronto con il sito urbano, potrebbe essere conseguenza dell'esposizione ad una maggiore concentrazione di ozono troposferico, che di solito si rileva in aree collinari remote rispetto ad aree antropizzate a più bassa quota (Forlani et al., 2005). Le foglie di ambiente urbano, ricoperte da un notevole deposito di particolato atmosferico e limitate dalla più scarsa disponibilità di acqua, sono interessate da un più basso tasso di traspirazione e di conseguenza da un più basso flusso di ozono, quindi meno esposte agli effetti negativi di quest'ultimo (Gerosa et al., 2005; Vitale et al., 2005). Inoltre nell'area urbana di Napoli le foglie di leccio sono interessate da una consistente presenza di ossidi di azoto nell'atmosfera. Ciò determina un maggior contenuto fogliare di N rispetto a foglie di aree remote (Alfani et al., 2000), con un più favorevole rapporto C/N per l'attacco microbico.

L'andamento della decomposizione delle lettiere di foglie di leccio seguito in questo studio, non è quindi da mettere solo in relazione ad eventuali effetti dell'accumulo degli IPA, ma agli effetti delle interazioni tra le diverse tipologie di inquinanti che interessano in misura diversa la decomposizione di foglie di diversa provenienza; l'ozono potrebbe interessare maggiormente le foglie di ambiente remoto, rallentandone la decomposizione, gli ossidi di azoto quelle di ambiente urbano, favorendola. Non appare evidente un effetto da attribuire agli IPA, da soli o in sinergia/antagonismo con altri inquinanti.

Periodo di incubazione (gg)	VS	PM	FF
	%p.s./giorno		
0-39	0,29	0,37	0,25
39-105	0,16	0,20	0,27
105-177	0,34	0,42	0,30
177-246	0,26	0,15	0,16
0-246	0,26	0,29	0,25

Tabella 8.2 Tasso di decomposizione delle lettiere di foglie di leccio dei siti remoto (VS), urbano (PM) e industriale (FF), espresso come % di peso secco/giorno.

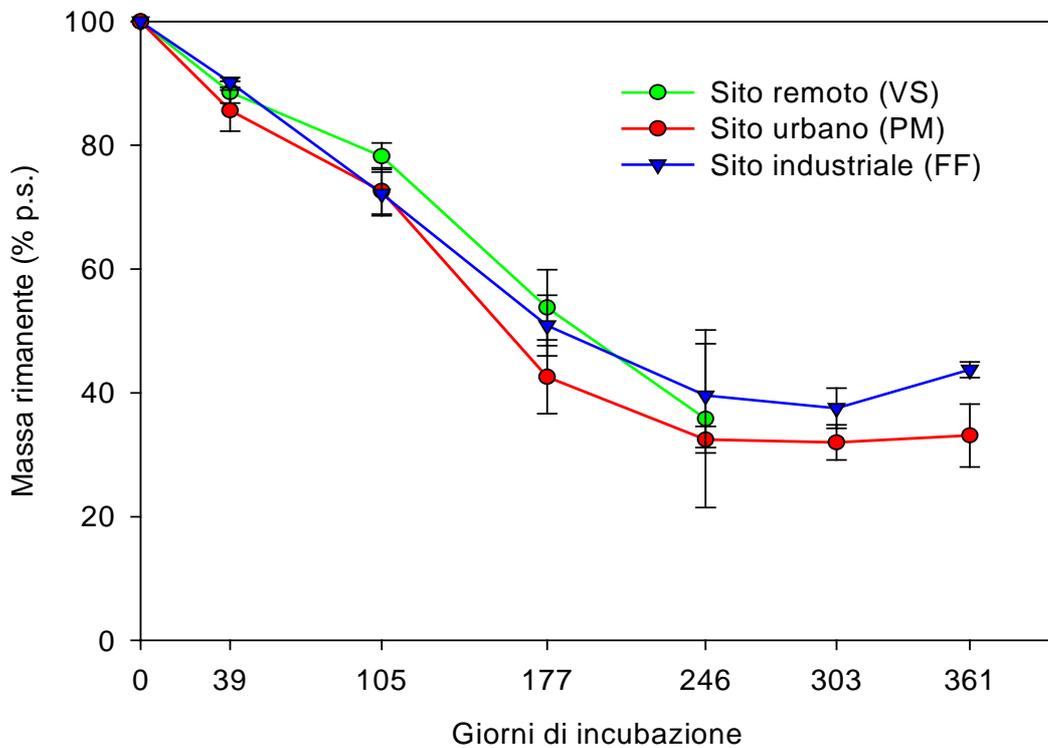


Figura 8.2 Decomposizione di lettiere di foglie provenienti dai siti remoto (VS), urbano (PM), e industriale (FF).



a



b

Figura 8.3 Lettiera in decomposizione di foglie di leccio provenienti dal sito urbano PM (a) e dal sito industriale FF (b), dopo 361 giorni di osservazione.

8.3 Dinamica degli IPA durante la decomposizione della lettiera di foglie

La concentrazione degli IPA, durante il processo di decomposizione delle foglie di leccio dei tre siti studiati, mostra oscillazioni che sono simili per le foglie con elevate concentrazioni di IPA e che si discostano dal trend relativo alle foglie del sito remoto, per il quale sono state misurate concentrazioni che incrementano nel tempo (Tab. 8.3). La concentrazione degli IPA nella lettiera di foglie varia in funzione non solo della loro decomposizione, ma anche in funzione della decomposizione di tutti i componenti più o meno degradabili delle foglie. Per verificare il trend di decomposizione degli IPA indipendentemente dagli altri componenti delle foglie, il loro contenuto è stato riportato in grafico come percentuale rispetto al valore iniziale per le lettiere ad elevato contenuto di IPA (Fig. 8.4). La concentrazione di IPA, al primo prelievo, appare diminuire nella lettiera di foglie del sito urbano (PM) mentre rimane pressoché costante in quella del sito industriale (FF). Nel periodo successivo il contenuto di IPA decremmenta fino al 16 e al 36% del valore iniziale, rispettivamente per il sito urbano e quello industriale. Dopo 246 giorni di osservazione, appare chiaro un consistente incremento percentuale di IPA nelle lettiere di entrambi i siti di difficile interpretazione. Alla fine del periodo di osservazione, il contenuto di IPA nelle lettiere in decomposizione appare fortemente ridotto rispetto al valore iniziale, con valori pari al 20 e al 48%, rispettivamente per il sito urbano e il sito industriale (Fig. 8.4). La percentuale di IPA nella lettiera di foglie del sito PM è risultata sempre più bassa di quella del sito FF, evidenziando per la lettiera del sito urbano una maggiore e più rapida decomposizione degli IPA (Fig. 8.6). La dinamica della decomposizione di lettiere di foglie provenienti dai siti remoto (VS), urbano (PM), e industriale (FF), è stata anche seguita separatamente per gli IPA a basso (LMW), medio (MMW) e ad alto (HMW) peso molecolare (Fig. 8.5). Durante il periodo di osservazione gli LMW sono rimasti pressoché invariati, mentre gli IPA a medio peso molecolare (MMW), hanno mostrato un decremento percentuale dal 73 al 34% del totale in VS, dall'80 al 40% in PM e dall'84 al 67% in FF. Gli IPA ad alto peso molecolare (HMW), sono risultati invece aumentare percentualmente, dal 13 al 55%, dal 15 al 42% e dal 9 al 30% del totale, rispettivamente per VS, PM e FF (Fig. 8.5).

Ciò trova riscontro nei risultati ottenuti da Howsam et al., (2001), i quali hanno dimostrato che nel ciclo degli IPA in natura gli idrocarburi a medio peso molecolare, tra cui il fenantrene, hanno tempi di residenza più brevi rispetto a quelli ad alto peso molecolare, quali benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene e benzo(g,h,i)terilene. Ciò può essere legato alle diverse caratteristiche chimico-fisiche dei composti, che risultano più facilmente biodegradabili da parte delle comunità dei decompositori quanto minore è il numero degli anelli aromatici e dunque maggiore è la loro idrosolubilità.

La concentrazione di IPA ad alto peso molecolare aumenta verosimilmente a causa della veloce decomposizione delle molecole più prontamente mineralizzabili, come è riportato in letteratura per le molecole più difficilmente decomponibili (Berg & McClaugherty, 2003). Inoltre gli IPA a quattro e più anelli aromatici sono più fortemente legati alla sostanza organica del suolo per cui sono meno biodisponibili (Juhasz & Naidu, 2000; Semple et al., 2007).

Tra gli IPA a medio peso molecolare, il fenantrene, il fluorantene e il pirene, appaiono decomporsi prima, come dimostra il loro decremento percentuale dopo 177 e 303 giorni di incubazione, delle lettiera investigate (Fig 8.6). Il contributo percentuale del fenantrene, nella lettiera di foglie provenienti da VS, passa dal 42 al 13% circa del totale, dal 20 al 10% in PM, e dal 38 al 12% in FF. Il fluorantene decrementa dal 15 all'8% in VS, dal 21 al 9% in PM, mentre rimane pressoché costante in FF. Il contributo percentuale del pirene al totale non varia in VS e FF, mentre in PM passa dal 26 al 12% del totale.

Il decremento di alcuni IPA nella lettiera di foglie potrebbe essere imputato a perdite abiotiche oltre che all'azione biologica. Diversi esperimenti di laboratorio hanno però dimostrato la maggiore importanza delle perdite biotiche di IPA rispetto a quelle abiotiche (Antizar-Ladislao et al., 2005). In uno studio di *bioremediation*, Allard et al. (2000) hanno provato che in presenza di batteri in grado di degradare gli IPA, il decremento di fluorantene e pirene nei suoli investigati era dovuto alla degradazione biologica e non a perdite di tipo abiotico. Wang et al. (2005), per saggiare l'importanza della idrosolubilità degli IPA ai fini della biodegradazione, hanno aggiunto un reagente (l'HPCD) in grado di incrementare la solubilità in acqua del pirene. I risultati hanno messo in evidenza che nel controllo non si verificavano perdite di pirene per

volatilizzazione o per trasformazioni abiotiche, mentre nelle vials contenenti HPCD, l'aumento della idrosolubilità del pirene incrementava la sua biodisponibilità e dunque la biodegradazione da parte di ceppi del genere *Burkholderia* presenti.

I funghi del marciume bianco, in particolare *Phanerochaete chrysosporium*, sono tra gli organismi che sembrano avere il maggiore potere degradativo nei confronti degli IPA (Sutherland, 1992; Morgan et al., 1993; Paszczynski & Crawford, 1995). Alcuni di essi producono enzimi extracellulari, tra cui perossidasi degradanti la lignina e manganese perossidasi che intervengono nella biodegradazione degli IPA (Augustin & Muncnerova, 1994).

Valentìn et al., (2006), in uno studio sul potere degradativo di alcune specie di funghi del marciume bianco, hanno rilevato che in suoli forestali la perdita di IPA è maggiore se la presenza di quelli ad elevato peso molecolare è minore. Gli IPA che vengono più facilmente degradati sono, nell'ordine decrescente di degradabilità, il fenantrene, il fluorantene, il pirene e il crisene.

Altre ricerche hanno posto invece l'attenzione su funghi non lignolitici, come *Cunninghamella elegans* (Cerniglia, 1993) e *Penicillium janthinellum* (Launen et al., 1995) che possono metabolizzare una grande varietà di IPA attaccandoli fino a trasformarli in metaboliti polari.

Sebbene gli studi sul potere degradativo dei funghi filamentosi siano piuttosto scarsi, recenti ricerche hanno messo in luce l'importanza di questi organismi, che risultano essere particolarmente abbondanti in siti a forte contaminazione da IPA. Potin et al. (2004), hanno isolato 21 specie di funghi filamentosi da un suolo contaminato da IPA e testato il potere degradativo di tali organismi sugli IPA, soprattutto su quelli ad alto peso molecolare. Il maggiore successo è stato ottenuto con l'inoculo di funghi miceliali piuttosto che spore e impiegando le specie *Coniothyrium* e *Fusarium*, soprattutto sugli IPA con più di tre anelli aromatici. La crescita del micelio può favorire la stabilizzazione dei funghi nel suolo, un maggiore contatto meccanico e una più forte interazione enzimatica con i substrati più insolubili e può dunque portare ad una maggiore degradazione degli IPA più recalcitranti. Anche la degradazione ad opera di batteri può causare la rimozione degli IPA dal suolo, in particolar modo l'attività di consorzi batterici misti che è in grado di degradare alcuni IPA (bifenile, fluorene,

fenantrene e pirene) nel suolo in condizioni anaerobiche (Ambrosoli et al., 2005). I *trends* di degradazione per ogni idrocarburo sono simili in tutte le condizioni, indicando che la conformazione molecolare prevale su tutti gli altri parametri nel controllare la degradazione. I risultati migliori sono stati ottenuti in presenza di glucosio o, ancor meglio, di acetato, che favoriscono fenomeni di co-metabolismo con formazione di composti più semplici che, esposti all'attacco microbico, risultano più facilmente degradabili. In tutti i casi, l'idrocarburo più facilmente degradato è stato il bifenile, a più basso peso molecolare e più idrosolubile. L'interazione mutualistica tra funghi e batteri può migliorare la capacità degradativa dei microrganismi nei confronti degli IPA (Kohlmeier et al., 2005), così come l'interazione tra piante (come *Oryza sativa* L.) e batteri (*Acinetobacter* sp.), (Gao et al., 2006).

In conclusione, i nostri dati, supportati da un consistente numero di recenti ricerche sulla capacità di funghi e batteri di degradare gli IPA, suggeriscono che per le comunità microbiche del suolo questa tipologia di inquinanti può rappresentare una risorsa piuttosto che un fattore di disturbo. L'attività degradativa di microrganismi, presenti sulle foglie nella fase di senescenza, determina nelle aree contaminate un considerevole decremento dell'accumulo di IPA, con una riduzione dell'input al terreno attraverso la caduta delle foglie.

<i>Giorni</i>	<i>0</i>	<i>39</i>	<i>105</i>	<i>177</i>	<i>246</i>	<i>303</i>	<i>361</i>
VS	63,9 (2,0)	182,7 (44,4)	260,6 (70,6)	143,1 (22,8)	802,7 (88,8)	425,7 (2,5)	n.d.
PM	868,2 (74,2)	768,4 (111,3)	454,2 (23,0)	287,5 (15,2)	1493,9 (101,6)	512,8 (42,5)	473,4 (91,1)
FF	644,1 (8,6)	715,6 (99,8)	485,2 (11,5)	437,3 (78,8)	1723,5 (82,8)	794,9 (41,9)	687,8 (41,2)

Tabella 8.3 Concentrazioni di IPA totali (\pm e.s.) nella lettiera di foglie di leccio dei siti VS, PM, e FF durante la decomposizione.

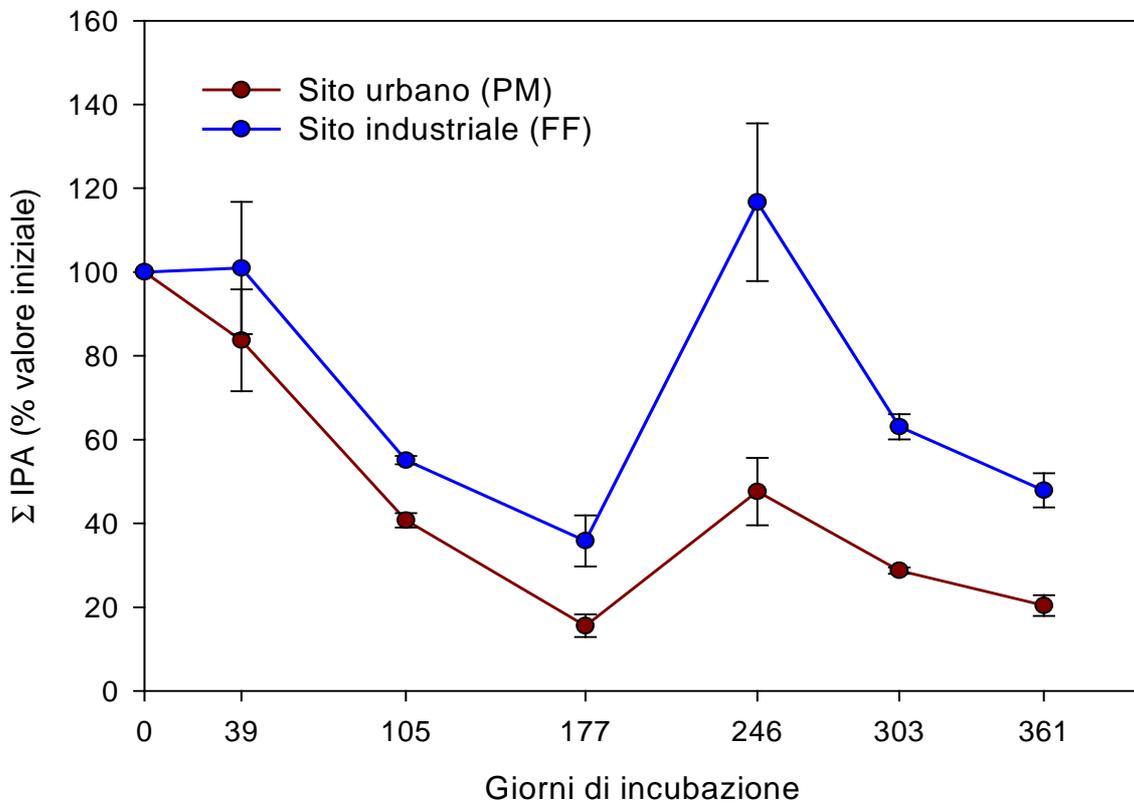


Figura 8.4 Dinamica degli IPA durante la decomposizione di lettiera di foglie provenienti dai siti urbano e industriale.

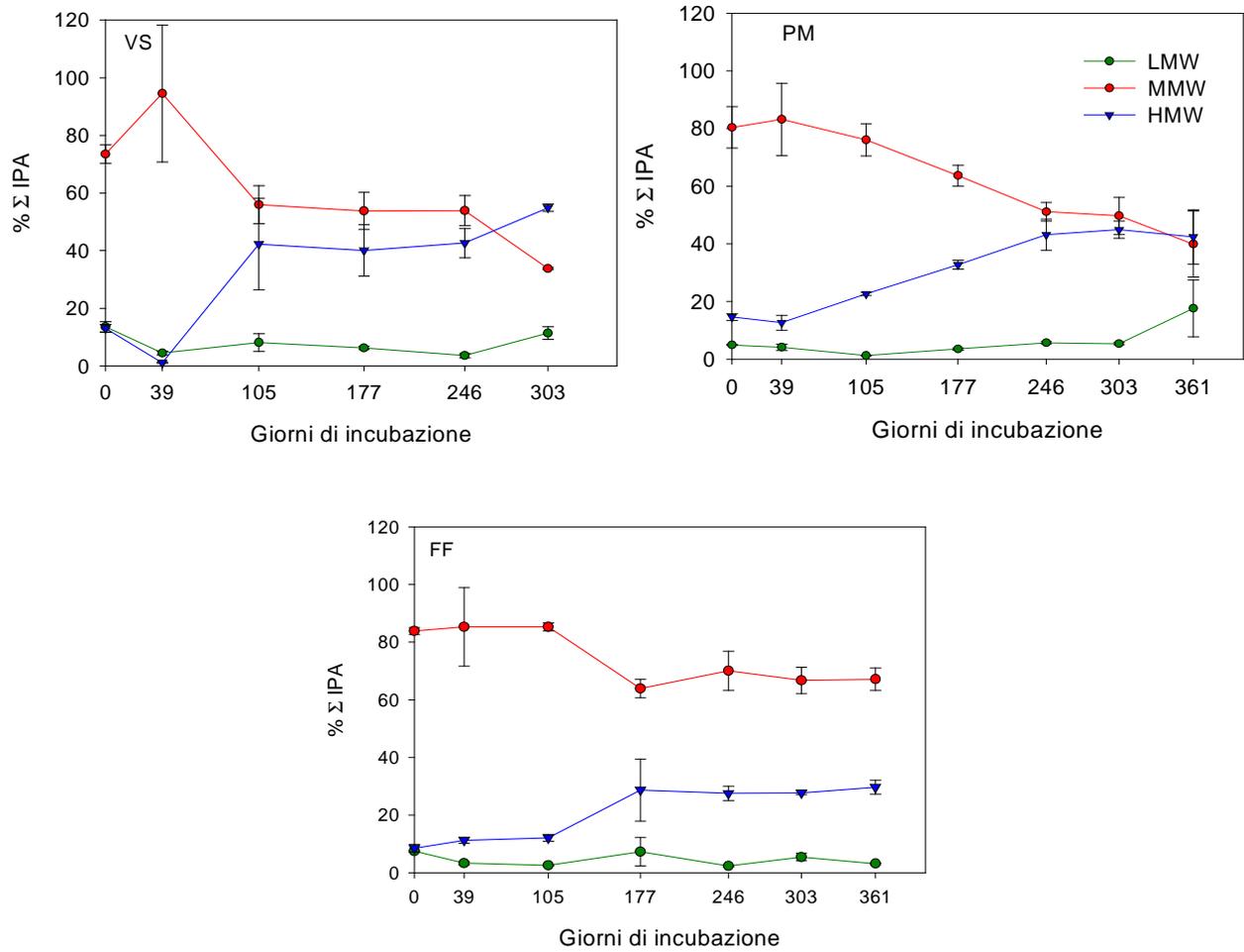


Figura 8.5 Dinamica di IPA a basso (LMW), medio (MMW) e alto peso molecolare (HMW), durante la decomposizione di lettiere di foglie provenienti dai siti remoto (VS), urbano (PM), e industriale (FF).

LMW= Ace, Act, Fln;

MMW= Phen, Antr, Flnt, Pyr, BaA, Chr;

HMW= BbKF, BeP, BaP, Peril, IcdP, DahA, BghiP.

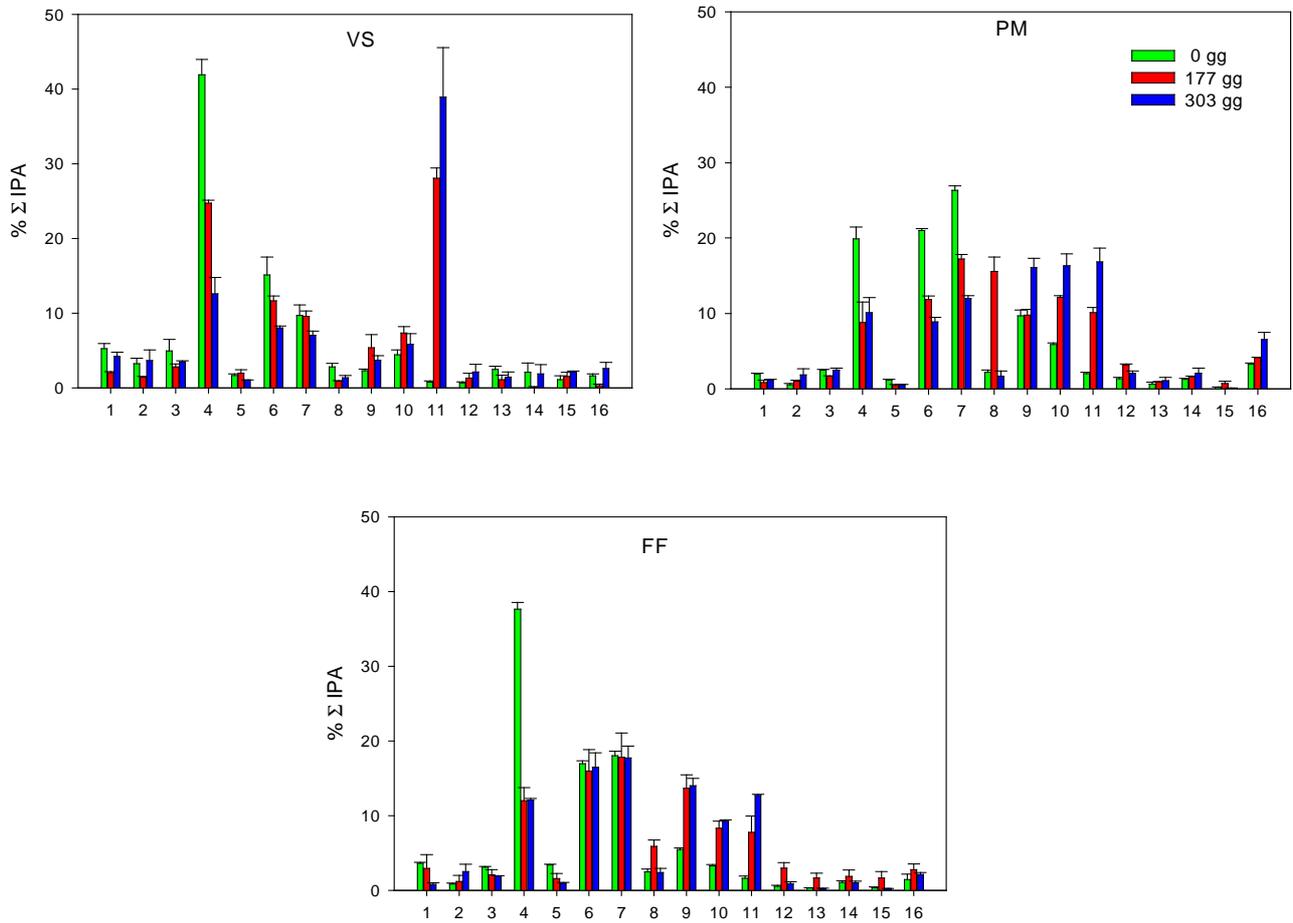


Figura 8.6 Contributo percentuale medio (\pm e.s.) di ciascun IPA al totale dopo 0, 177 e 303 giorni di incubazione di lettiere di foglie di leccio provenienti dal sito remoto (VS), urbano (PM), e industriale (FF).

(1=Ace, 2=Act, 3=Fln, 4=Phen, 5=Antr, 6=Flnt, 7=Pyr, 8=BaA, 9=Chr 10=BbKF, 11=BeP, 12=BaP, 13=Peril, 14=IcdP, 15=DahA, 16=BghiP).

Conclusioni

La ricerca effettuata ha permesso di ottenere importanti informazioni sull'accumulo degli IPA nelle foglie, dando la possibilità di definire ulteriori accorgimenti nel *modus operandi* per l'impiego del leccio come biomonitor della contaminazione da IPA.

L'analisi dei lipidi nelle foglie di leccio ha consentito di verificare che per questa specie l'accumulo di IPA non è influenzato dal contenuto lipidico, verosimilmente perché la cuticola non è l'unico *sink* di accumulo per questi inquinanti.

La valutazione del contenuto di IPA nelle foglie di uno, due e tre anni, non ha evidenziato un particolare trend di accumulo in funzione dell'età delle foglie, che pertanto non appare un parametro determinante nel biomonitoraggio degli IPA mediante foglie di leccio.

Le concentrazioni di IPA riscontrate nelle foglie hanno evidenziato chiari gradienti di contaminazione spaziale, confermando che il leccio è un valido biomonitor. Il contenuto di IPA nelle foglie è risultato molto più alto nei siti a carattere urbano-industriale rispetto alle aree remote.

L'apporto dei singoli IPA al contenuto totale ha evidenziato la maggiore presenza di IPA a medio peso molecolare quali fenantrene, fluorantene, pirene e crisene nei siti a carattere urbano-industriale, mentre nei siti remoti sono risultati più abbondanti gli idrocarburi più leggeri, in particolar modo naftalene e acenaftilene.

Il processo di decomposizione della lettiera di foglie proveniente da tre siti a diverso impatto (remoto, urbano e industriale), avviene con trend molto simili. L'accumulo

degli IPA nelle foglie dei siti urbano e industriale non ha rallentato il processo di decomposizione.

Durante il processo di senescenza delle foglie, si è osservata una notevole riduzione degli IPA totali imputabile al decremento degli idrocarburi a basso e a medio peso molecolare.

Rilevante è risultata la degradazione degli IPA durante il processo di decomposizione delle foglie; gli IPA a medio peso molecolare sono risultati quelli che si degradano maggiormente, gli IPA ad elevato peso molecolare quelli che si degradano meno.

Lo studio effettuato ha permesso di ottenere importanti informazioni sul ciclo degli IPA nei sistemi terrestri sebbene richieda ulteriori approfondimenti che potrebbero mettere in luce il legame tra gli IPA e il turnover del carbonio durante la decomposizione della lettiera di foglie, in particolar modo mediante la definizione del ruolo della microflora nel ciclo degli IPA in natura.

Bibliografia

Aboal J. R., Fernandez J. A., Carballeira A., (2004). Oak leaves and pine needles as biomonitors of airborne trace elements pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 215-225.

Allard A.-S., Remberger M., Neilson A. H., (2000). The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 43-49.

Alfani A., Baldantoni D., Maisto G., Bartoli G., Virzo De Santo A., (2000). Temporal and spatial variation in C, N, S and trace element contents in the leaves of *Quercus ilex* within the urban area of Naples. *Environmental Pollution*, 109, 119-129.

Alfani A., Bartoli G., Caserta P., Andolfi G., (1995). Amount and elemental composition of dry deposition to leaf surface of *Quercus ilex* in the urban area of Naples. *Agricoltura Mediterranea Special Volume*, 15, 194-199.

Alfani A., Bartoli G., Virzo De Santo A., Lombardi M., Rutigliano F., Fioretto A., Gargiulo E., (1989). Leaf elemental composition of *Quercus ilex* L. in the urban area of Naples. Trace elements Conference Proceedings "Man and Environment " Roma, 24 ottobre.

Alfani A., De Nicola F., Maisto G., Prati M. V., (2005). Long-term PAH accumulation after bud break in *Quercus ilex* L. leaves in a polluted environment. *Atmospheric Environment*, 39, 307-314.

Alfani A., Maisto G., Prati M. V., Baldantoni D., (2001). Leaves of *Quercus ilex* L., as biomonitors of PAHs in the air of Naples (Italy). *Atmospheric Environment*, 35, 3553-3559.

Ambrosoli R., Petruzzelli L., Minati J. L., Marsan F.A., (2005). Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere*, 60, 1231-1236.

Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J., Beck A. J., (2005). Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting. *Waste Management*, 25, 281–289.

Augustin J., Muncnerova D., (1994). Degradation pathways of aromatic hydrocarbons in fungi and bacteria. *Biologia*, 49, 289-299.

Bae S. Y., Seung M. Y, Yong P. K, (2002). Temporal and spatial variations of the particle size distribution of PAHs and their dry deposition fluxes in Korea. *Atmospheric Environment*, 36, 5491-5500.

Baek S. O., Field R. A., Goldstone M. E., Kirk P. W., Lester J. N., Perry R., (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behaviour. *Water, Air, & Soil Pollution*, 60, 279-300.

Barber J. L., Thomas G. O., Kerstiens G., Jones K. C., (2004). Current issues and uncertainties in the measurement and modelling air-vegetation exchange and within-plant processing for POPs. *Environmental Pollution*, 128, 99-138.

Bargagli R., (1998). Trace Elements in Terrestrial Plants. An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. SpringerVerlag, Berlin.

Bargagli R., Nimis P.L., Monaci F., (1997). Lichen biomonitoring of trace element deposition in urban, industrial and reference areas of Italy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 11, 173-175.

Berg B., McClaugherty C., (2003). Plant Litter. Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration. Springer-Verlag, Germany.

Bidleman T. F., (1988). Atmospheric processes. *Environmental Science and Technology* 22, 361-367.

Böhme F., Welsch-Pausch K., McLachlan M., (1999). Uptake of airborne semivolatile organic compounds in agricultural plants: Field measurements of interspecies variability. *Environmental Science and Technology*, 33 , 1805–1813.

Boström C.-E., Gerde P., Hanberg A., Jernstrom B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Tornqvist M., Westerholm R., Victorin K., (1999). Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the ambient air. Swedish Environmental Protection Agency, pubblicato su: *Environmental Health and Perspectives*, 2002. Vol. 110, supp. 3, 451-488.

Caricchia A. M., Chiavarini S., Pezza M., (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). *Atmospheric Environment*, 33, 3731-3738.

Carreiro M. M., Howe K., Parkhurst D. F., Pouyat R. V., (1999). Variation in quality and decomposability of red oak leaf litter along an urban rural gradient. *Biol Fertil Soils*, 30, 258-268.

Cerniglia C. E., (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331–338.

Chapin F. S. III, Matson P. A., Mooney H. A., (2002). Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer-Verlag, U.S.A.

Coleman P., Conolly C., Donovan B., Jenkins M., Jones K., Lee R., Peters A., Watterson J., (1999). Toxic Organic Micropollutants Monitoring 1996 to 1999. AEAT-4970, September.

CONCAWE (1998). Report no. 98/55. Polycyclic aromatic hydrocarbons in automotive exhaust emission and fuels, Brussels.

Cotrufo M. F., Virzo De Santo A., Alfani A., Bartoli G., De Cristofaro A., (1995). Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in *Quercus ilex* L. woods. *Environmental Pollution*, 89, 81-87.

De Lillis M., Fontanella A., (1992). Comparative phenology and growth in different species of the Mediterranean maquis of central Italy. *Vegetatio*, 99-100, 83-96.

De Nicola F., Maisto G., Prati M. V., Alfani A., (2005). Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. *Chemosphere*, 61, 432-440.

De Nicola F., Maisto G., Prati M. V., Alfani A. Leaf accumulation of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Quercus ilex* L. *Environmental Pollution*, in press.

Debazac E. F., (1983). Temperate broad-leaved evergreen forests of the Mediterranean region and Middle East. In: *Temperate broad-leaved evergreen forests* (ed: J .D. Ovington), Elsevier, Amsterdam: pp. 107-123.

Edwards, N. T., (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment: a review. *Journal of the Environmental Quality*, 12, 427-441.

European Commission (2001) Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Position Paper, July 27th 2001.

European Communities (1996) Council Directive 96 62 EC of 27 September 1996 on ambient air quality assessment and management. *Official Journal of European Communities* No. L 296 of 21/11/1996.

European Communities (1999). Council Directive 1999/30/EC relating to limit values for sulphur dioxide, oxides of nitrogen, particulate matter and lead in ambient air. *Official Journal of European Communities*. No. L 163/41 of 29/6/1999.

Fardell P. J., Murrell J. M., Murrell J. V., (1986). Chemical fingerprint studies of fire atmospheres. *Fire Materials*, 10, 21-28.

Fertmann R., Tesseraux I., Schümann M., Neus H., Prinz B., (1999). Auswertung der in der BRD vorliegenden Immissionsmessdaten von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (1999 –1998) – Berichtsentwurf. Im Auftrag des Unterausschusses Wirkungsfragen des Länderausschusses für Immissionsschutz (LAI). Hamburg.

Forlani A., Merola G., Fagnano M., (2005). Ozone effects on vegetation in three different localities of Campania Region (Southern Italy). *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol. 14, No. 6, 478-483

Franzaring J., van der Eerden L. J. M., (2000). Accumulation of airborne persistent organic pollutants (POPs) in plants. *Basic and Applied Ecology*, 1, 25–30.

Fraunhofer ITA, FoBiG, ifeu, (1999). Immissionsnaher Risikovergleich von Diesel- und Ottoabgasen, Auswirkung zukünftiger Grenzwerte auf die Luftqualität und die Gesundheit, under contract to Umweltbundesamt (UBA), Berlin.

Gao Y., Yu X. Z., Wu S. C., Cheung K. C., Tam N. F. Y., Qian P. Y., Wong M.H., (2006). Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Science of the Total Environment*, 372, 1-11.

Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S., (2002). Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment*, 36, 4069-4075.

Gerosa G., Vitale M., Finco A., Manes F., Ballarin Denti A., Cieslik S., (2005). Ozone uptake by an evergreen Mediterranean Forest (*Quercus ilex*) in Italy. Part I: Micrometeorological flux measurements and flux partitioning. *Atmospheric Environment*, 39, 3255-3266.

Harner T., Bidleman T. F., (1998). Octanol air partition coefficient for describing particle/gas partitioning of aromatic compounds in urban air. *Environmental Science and Technology*, 32, 1494-1502.

Hauke V., Schreiber L., (1998). Ontogenic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta*, 207, 67-75.

Haynes R. J., (1986). The decomposition process: Mineralization, immobilization, humus formation, and degradation. In: *Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System*. (ed: R. J. Haynes), Academic Press, Orlando, FL : pp. 52-126.

Holoubek I., Kořínek P., Šeda Z., Schneiderová E., Holoubková I., Pacl A., Tříška J., Cudlín P., Čáslavský J., (2000). The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution*, 109, 283-292.

Horstmann M., McLachlan M. S., (1998). Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to two forests canopies. *Atmospheric Environment*, 32, 1799-1809.

Howsam M., Jones K. C., Ineson P., (2000). PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I - Concentrations and profiles. *Environmental Pollution*, 108, 413-424.

Howsam M., Jones K. C., Ineson P., (2001). Dynamics of PAH deposition, cycling and storage in a mixed deciduous (*Quercus-Fraxinus*) woodland ecosystem. *Environmental Pollution*, 113, 163-176.

Howsam M., Jones K. C., Ineson P., (2001). PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season. *Chemosphere*, 44, 155-164.

IARC, (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1-42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to Humans, Supplement 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Jetter R., Riederer M., Lenzian K. J., (1996). The effects of dry O₃, SO₂ and NO₂ on reconstituted epicuticular wax tubules. *New Phytologist*, 133, 207–216.

Jouraeva V. A., Johnson D. L., Hassett J. P., Nowak D. J., (2002). Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tilia xeuchlora* and *Pyrus calleryana*. *Environmental Pollution*, 120, 331-338.

Jouraeva V. A., Johnson D. L., Hassett J. P., Nowak D. J., Shipunova N. A., Barbarossa D., (2006). Role of sooty mold fungi in accumulation of fine-particle-associated PAHs and metals on deciduous leaves. *Environmental Research*, 102, 272-282.

Juhasz A. L., Naidu R., (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 57-88.

Kipopoulou A. M., Manoli E., Samara C., (1999). Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*, 106, 369-380.

Kiss G., Varga-Puchony Z., Tolnai B., Varga B., Gelencsér A., Krivácsy Z., Hlavay J., (2001). The seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation and aerosol near Lake Balaton, Hungary. *Environmental Pollution*, 114, 55-61.

Kohlmeier S., Smits T. H. M., Ford R., Keel C., Harms H., Wick L. Y., (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant degrading bacteria by fungi. *Environmental Science and Technology*, 39, 4640-4646.

Kömp P., McLachlan M., (1997). Interspecies variability of the plant/air partitioning of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology*, 31, 2944–2948.

Krauss M., Wilcke W., Martius M., Bandeira A. G., Garcia M. V. B., Amelung W., (2005). Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. *Environmental Pollution*, 135, 143-154.

Kuhn A., Ballach H. J., Wittig R., (1998). Seasonal variation of the distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in poplar leaves. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7, 164–169.

Kulkarni P., Venkataraman C., (2000). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Mumbai, India. *Atmospheric Environment*, 34, 2785-2790.

Kylin H., Grimvall E., Oestman C., (1994). Environmental Monitoring of Polychlorinated Biphenyls Using Pine Needles as Passive Samplers. *Environmental Science and Technology*, 28, 1320-1324.

Larcher W., (1995). Water relations. In: *Physiological Plant Ecology*, Springer, Berlin: pp. 215-275.

Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E., Moore M., (1995). The oxidation of pyrene and benzo(a)pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 477-488.

Lehndorff E., Schwark L., (2004). Biomonitoring of air quality in the Cologne Conurbation using pine needles as a passive sampler-Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment*, 38, 3793-3808.

Levin B.C., (1987). A summary of the NBS literature reviews on the chemical nature and toxicity of pyrolysis and combustion products from seven plastics: acrylonitrile-butadiene-styrenes (ABS), nylons, polyesters, polyethylenes, polystyrenes, poly(vinyl chlorides) and rigid polyurethane foams. *Fire Materials*, 11, 143-157.

Liu X. X., Korenaga T., (2001). Dynamics analysis for the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice. *Journal of Health Science*, 47, 446-451.

Lobert J. M., Warnatz J., (1993). Emissions from the combustion process in vegetation. In: Crutzen P. J., Goldammer (Eds.), *Fire in the Environment: The Ecological, Atmospheric, and Climatic Importance of Vegetation Fires*. Wiley, Chichester, UK, pp. 15-37.

Lyll R. J., Hooper M. A., Mainwaring S. J., (1988). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Latrobe Valley. *Atmospheric Environment*, 22, 2549-2555.

Martins C. M., Mesquita S. M. M., Vaz W. L. C., (1999). Cuticular Waxes of the Holm (*Quercus ilex* L. subsp. *Ballota* (Desf.) Samp.) and Cork (*Q. suber* L.) Oaks. *Phytochemical Analysis*, 10, 1-5.

McLachlan M. S., (1996). Bioaccumulation of Hydrophobic Chemicals in Agricultural Feed Chains. *Environmental Science and Technology*, 30, 252–259.

Menichini E., Monfredini F., Merli F., (1999). The temporal variability of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome, 1993-1998. *Atmospheric Environment*, 33, 3739-3750.

Mitera J., Michael J., (1985). The combustion products of polymeric materials III.: GC-MS analysis of the combustion products of polyethylene, polypropylene, polystyrene and polyamide. *Fire Materials*, 9, 111-117.

Monaci F., Bargagli R., (1997). Barium and other trace metals as indicators of vehicle emissions. *Water Air and Soil Pollution*, 100, 89-98.

Monaci F., Moni F., Lanciotti E., Grechi D., Bargagli R., (2000). Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. *Environmental Pollution*, 107, 321-327.

Morgan P., Lee S. A., Lewis S. T., Sheppard A. N., Watkinson R. J., (1993). Growth and biodegradation by white rot fungi inoculated into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 279–287.

Müller J. F., Hawker D. W., McLachlan M. S., Connell D. W., (2001). PAHs, PCDD/Fs, PCBs and HCB in leaves from Brisbane, Australia. *Chemosphere*, 43, 507-515.

Muraleedharan T. H., Radojevic M., Waugh A., Caruana A., (2000). Emissions from the combustion of peat: an experimental study. *Atmospheric Environment*, 34, 3033-3035.

Nauss K.M., (1995). Critical issues in assessing the carcinogenicity of diesel exhaust: a synthesis of current knowledge. In: Diesel Exhaust: A Critical Analysis of Emissions,

Exposure and Health Effects. Health Effects Institute, Diesel Working Group, Cambridge, pp 6-11.

Paszczynski A., Crawford R.L., (1995). Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Progress*, 11, 368–379.

Pavao-Zuckerman M., Coleman D. C., (2005). Decomposition of chestnut oak (*Quercus prinus*) leaves and nitrogen mineralization in an urban environment. *Biology and Fertility of Soils*, 41, 343-349.

Pignatti S., (1982). Flora d'Italia, vol 1, Ed agricole, Bologna: p.115.

Poborski P., (1988). Pollutant penetration through the cuticle. In “ Air pollution and plant metabolism”. S. Schulte-Hostede et al. (Eds.), Elsevier, London, UK, 19-35.

Posthumus A.C., (1984). Monitoring Levels and Effects of Air Pollutants. *Air Pollution and Plant Life*. Treshow M. Edition.

Potin O., Rafin C., Veignie E., (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 45-52.

Prügel B., Loosteveldt P., Garrec J. P., (1994). Changes in the content and constituents of the cuticular wax of *Picea abies* (L.) Karst in relation to needle ageing and tree decline in five European forest areas. *Trees*, 9, 80–87.

Rauret G., Llauradó M., Tent J., Rigol A., Alegre L .H., Utrillas M. J., (1994). Deposition on holm oak leaf surfaces of accidentally released radionuclides. *The Science of the Total Environment*, 157, 7-16.

Richnow H. H., Seifert R., Hefter J., Link M., Francke W., Schaefer G., Michaelis W., (1997). Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter: Mode of binding. *Organic Geochemistry*, 26, 745-758.

Riederer M., (1989) The cuticles of conifers: Structure, composition and transport properties. In: "Ecological Studies". Schulze E. D. et al. (Eds.), vol. 77, Springer Verlag, 158-192.

Robertson G.P., Paul E. A., (2000). Decomposition and soil organic matter dynamics. In: Chapin F. S. III, Matson P. A., Mooney H. A., (2002). *Principles of Terrestrial ecosystem Ecology*. Springer-Verlag, U.S.A: p.157.

Salisbury F. B., Ross C., (1992). *Plant Physiology*, 4th edn. Wadsworth Publishing, Belmont, California.

Semple K. T., Doick K. J., Wick L. Y., Harms H., (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurements. *Environmental Pollution*, 150, 166-176.

Simonich S. L., Hites R., (1994a). Importance of vegetation in removing polycyclic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature*, 370, 49-51.

Simonich S. L., Hites R., (1995). Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29, 2905-2914.

Simonich S. L., Hites R.A., (1994b). Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 28, 939-943.

Sutherland J. B., (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 53-62.

Swift M. J., Heal O. W., Anderson J. M., (1979). Decomposition in terrestrial Ecosystems. Blackwell Scientific, Oxford, UK.

Tao S., Jiao X. C., Chen S. H., Liu W. X., Coveney R. M. Jr, Zhu L. Z., Luo Y. M., (2006). Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Pollution*, 140, 406-415.

Terradas J., (1999). Holm oak and holm oak forests: an introduction. In: *Ecology of Mediterranean evergreen oak forests* (eds: F. Rodà, J. Retana, C.A. Gracia, J. Bellot), Springer-Verleg, Berlin: pp. 3-14.

Uffindell L. A., Ineson P., Meharg A. A., (2005). Enchytraeid worms retard polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a coniferous forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 27–34.

Valentín L., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M., (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58, 15-21.

Valerio F., Brescianini S., Lastraioli S., Coccia S., (1989). Metals in leaves as indicators of atmospheric pollution in urban areas. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 37, 245-251.

Van Brummelen T. C., Verweij R. A., Wedzinga S. A., Van Gestel C. A. M., (1996). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in earthworms and isopods from contaminated forest soils. *Chemosphere*, 32, 315-341.

Vitale M., Gerosa G., Ballarin Denti A., Manes F., (2005). Ozone uptake by an evergreen mediterranean forest (*Quercus ilex* L.) in Italy—Part II: flux modelling. Upscaling leaf to canopy ozone uptake by a process-based model. *Atmospheric Environment*, 39, 3267-3278.

Wagrowski D. M, Hites R. A., (1997). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban, Suburban, and Rural Vegetation. *Environmental Science and Technology*, 31, 279-282.

Wang J -M., Maier R. M., Brusseau M. L., (2005). Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) on the bioavailability and biodegradation of pyrene. *Chemosphere*, 60, 725–728.

Wang X., Wang W.-X., (2006). Bioaccumulation and transfer of benzo(a)pyrene in a simplified marine food chain. *Marine Ecology progress Series*, 312, 101–111.

Westerholm R., Alsberg T., Frommelin Å., Strandell M., Rannug U., Winquist L., Grigoriadis V., Egebäck K. E., (1988). Effect of Fuel Polycyclic aromatic Hydrocarbon Content on the Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Mutagenic Substances from a Gasoline-Fueled Automobile. *Environmental Science and Technology*, 22, 925-930.

Westerholm R., Li H., (1994). A Multivariate Statistical Analysis of Fuel Related Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Heavy Duty Diesel Vehicles. *Environmental Science and Technology*, 28, 965-992.

Wheatley L., Levendis Y. A., Vouros P., (1993). Exploratory study on the combustion and PAH emission of selected municipal waste plastics. *Environmental Science and Technology*, 27, 2885-2895.

Wild E., Dent J., Barber J. L., Thomas G. O., Jones K. C., (2004). A Novel Analytical Approach for Visualizing and Tracking Organic Chemicals in Plants. *Environmental Science and Technology*, 38, 4195-4199.

Wild E., Dent J., Thomas G. O., Jones K. C., (2005). Real-Time Visualization and Quantification of PAH Photodegradation on and within Plant Leaves. *Environmental Science and Technology*, 39, 268-273.

Wild E., Dent J., Thomas G. O., Jones K. C., (2006). Visualizing the Air-To-Leaf Transfer and Within-Leaf Movement and Distribution of Phenanthrene: Further Studies Utilizing Two-Photon Excitation Microscopy. *Environmental Science and Technology*, 40, 907-916.

Wild S. R., Jones K. C., (1995). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United Kingdom Environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, 88, 91-108. *Environmental Pollution*, 76, 25-32.

Yang S. Y., Connell D. W., Hawker D. W., Kayal S. I., (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons in air, soil and vegetation in the vicinity of an urban roadway. *The Science of the Total Environment*, 102, 229-240.

Ringraziamenti

Ringrazio la prof.ssa Anna Alfani, che mi ha guidato con grande disponibilità come tutore e la dott.ssa Flavia De Nicola per i preziosi consigli.

Un ringraziamento speciale va all'Ing. Maria Vittoria Prati per la grande affabilità e cortesia con cui mi ha seguita durante la sperimentazione presso il laboratorio chimico dell'Istituto Motori del CNR di Napoli.

Desidero ringraziare inoltre tutti i giovani dottorandi, ricercatori e assegnisti con cui ho condiviso questa bellissima esperienza di dottorato, in particolar modo la dott.ssa Anna Leone, l'Ing. Paola Forte, la dott.ssa Angela Meola e il dott. Fabrizio Esposito, che mi sono stati vicini anche in momenti dolorosi.

Infine ringrazio la mia famiglia che mi ha incoraggiata anche quando serie difficoltà personali avrebbero potuto intralciare l'attività di questi anni, e Giovanni, che mi è sempre vicino con amore e disponibilità.

Un ringraziamento di cuore va a chi non potrà condividere con me la gioia della conclusione di questa attività di dottorato, ma che tre anni fa mi suggerì di vivere questa esperienza e a cui devo tutto: mio padre.

C.L.