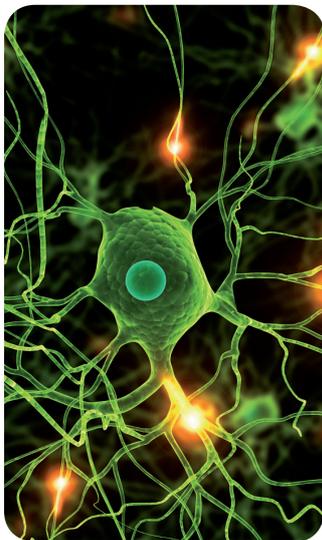




MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias
/ 15-16

Biodiversidad



**Efecto de la minería
de cobre sobre
*Ptychostomum
capillare*:
Uso como
bioindicador
y fitoestabilizador**
Nuria Jiménez Elvira

Efecto de la minería de cobre sobre *Ptychostomum capillare*:

Uso como bioindicador y
fitoestabilizador



Nuria Jiménez Elvira
Trabajo de fin de máster
Máster de Biodiversidad – Curso 2015/2016

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Cómo afecta la minería al entorno	3
El cobre como metal pesado y sus efectos en los organismos vegetales.....	5
Los briófitos y el cobre.....	6
Bioindicación directa e indirecta.....	7
Especie estudiada	9
Importancia de la remediación de suelos	10
Hipótesis y objetivos	12
Material y métodos	13
Elección de la zona de estudio y de la especie	13
Área de estudio.....	14
Zonación.....	15
Medidas tomadas.....	16
Análisis de suelos.....	18
Contenido de cobre en tejidos	20
Metodología estadística.....	22
Resultados	24
Cobertura vegetal y pedregosidad	24
Análisis de suelo.....	24
Análisis de cobre en los tejidos	26
Análisis de características poblacionales	27
Observaciones/Caracteres cualitativas	34
Análisis histoquímicos y MEB-EDAX	35
Discusión	39
Estado del suelo y contenido de cobre en los tejidos	39
Efectos del cobre en los epífitos de los musgos	40
Efecto del cobre en las variables características del estado y desarrollo poblacional	41
Efectos de otros factores ambientales	42
Caracteres cualitativos: presencia de protonema persistente.....	43
Mecanismos de resistencia en <i>Ptychostomum capillare</i> y uso como bioindicador	44
Uso de <i>Ptychostomum capillare</i> para la remediación de suelos mineros.....	45
Conclusiones	47
Bibliografía	49

Resumen

La minería es una de las principales fuentes de contaminación de suelos por metales pesados. Las explotaciones mineras producen profundas perturbaciones físicas y químicas en el terreno. De la contaminación generada por la minería los metales pesados constituyen unos de los contaminantes más estudiados por su toxicidad y persistencia en el suelo. En concreto, el cobre afecta al desarrollo de los musgos y a sus relaciones interespecíficas con otros vegetales. Tradicionalmente, los briófitos son considerados buenos bioindicadores de los efectos de los metales pesados debido a su baja resistencia a la entrada de contaminantes. Aunque, existe cierta controversia sobre la utilidad de estos organismos para la bioindicación directa de los metales pesados.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la minería de cobre sobre las poblaciones de *Ptychostomum capillare*, un musgo clasificado como tolerante. Más específicamente se analizarán las modificaciones producidas por la contaminación de cobre en algunos parámetros de crecimiento y reproducción y sus relaciones interespecíficas con otras especies de briófitos, líquenes y algas. También hemos estudiado la absorción de cobre por los tejidos del musgo en relación con el cobre ambiental. Para ello establecimos nueve parcelas (1 x 1 m) a lo largo de un gradiente, desde concentraciones muy elevadas a concentraciones bajas de este metal en el entorno de una mina de cobre en desuso en Lozoyuela (Madrid). En cada parcela medimos abundancia y tamaño de los céspedes de *P. capillare*, parámetros de crecimiento, daño observado en las estructuras vegetativas y reproductivas, y la estructura de la comunidad (presencia de otros organismos en las parcelas y comunidades de epífitos).

Observamos un efecto significativo de los altos niveles de cobre en la densidad de ejes, el tamaño de las yemas rizoidales, el porcentaje de amarilleamiento y el porcentaje de otros organismos. La relación positiva entre el nivel de cobre y la densidad podría deberse al descenso de la competencia con otros briófitos. Además, observamos la presencia de protonema persistente en las parcelas con mayor contenido en este contaminante. Asimismo, hay otros parámetros ambientales que afectan al desarrollo de *P. capillare*, como la humedad o la materia orgánica y que interactúan con el efecto del cobre aumentando la variabilidad en las variables de estado y haciendo en ocasiones difícil individualizar el efecto debido exclusivamente a este contaminante. El contenido de cobre en los tejidos fue menor de lo esperado en las parcelas con mayor concentración de este metal pesado. En este sentido, discutimos la existencia de un mecanismo de exclusión del cobre en este musgo y como esto comprometería su uso en bioindicación directa. Proponemos finalmente su uso en la remediación de terrenos contaminados por cobre debido a su resistencia a este metal y a la baja competencia con otras especies permitiendo la sustitución cuando mejoran las condiciones del suelo.

Abstract

Mining industry is one of the main sources of heavy metal soil pollution. Mineral extraction produces profound physical and chemical disturbance. Among the many effects produced by mining heavy metals are among the most studied contaminants due to their toxicity and persistence in the soil. Specifically, copper affects significantly moss development and interspecific relationships among plants. Bryophytes are considered good indicators of the effects of heavy metal contamination due to their high permeability to contaminants. However, it is unclear how these contaminants affect mosses. Besides, there is some controversy about the reliability of these organisms for direct heavy metal bioindication.

This work aims to study the effect of copper mining on *Ptychostomum capillare* a moss known to be tolerant to contamination. Specifically we will study disturbances in some growth and reproductive parameters and their interspecific relationships with other species of bryophytes, lichens and algae. We also studied the absorption of copper in the moss tissues related to environmental copper. To do so, we established nine plots (1 x 1 m) along a gradient, from very high to low concentrations of this metal in the mine tailings of an obsolete copper mine in Lozoyuela (Madrid). In each plot, we recorded the abundance and size of the *P. capillare* patches, the growth parameters and the observed damage in vegetative and reproductive structures, and the community structure (presence of other organisms in the plots and epiphyte communities).

We observed a significant effect of high copper content on shoot density, size of the rhizoidal gemmae, yellowing percentage and percentage of other organisms. The positive relationship between copper concentration and density might be due to the decrease of the competition with other bryophytes. Additionally, we have observed persistent protonemata in the plots with the highest copper concentrations. Besides, other environmental parameters seem to be affecting the development of *P. capillare*, such as humidity and organic matter. These parameters interact with the effect of copper increasing the variability of the development variables and making difficult to identify the effect exclusively related to copper content. The concentration of this contaminant was lower than expected in the plots with the highest copper content. We discuss the existence of an exclusion mechanism that could explain the high tolerance to copper of this moss, and that could compromise its use in direct bioindication. Finally, we propose the use of *P. capillare* as a good candidate for use in remediation of soils with high copper content since it has high tolerance to this heavy metal and, at the same time, low competitive abilities so that is easily overcome by other species as soon as the soil conditions improve.

Introducción

Cómo afecta la minería al entorno

La contaminación ambiental es una de las causas de pérdida de la biodiversidad en todo el planeta. En concreto la contaminación de los suelos es un problema difícil de remediar ya que el suelo constituye un medio muy complejo y heterogéneo espacial y temporalmente (Havlicek, 2012). Este tipo de contaminación tiene especial importancia en nuestra sociedad porque genera pérdidas tanto en el medio natural como en explotaciones agrícolas (Schade & Pimentel, 2010). En consecuencia la contaminación de suelos es uno de los problemas ambientales más preocupantes. Su caracterización precisa, así como la evaluación de los efectos que produce y los métodos de recuperación de los suelos constituyen un importante reto ambiental que ha dado lugar a un incremento sustancial en el número de trabajos sobre contaminación de suelos en las últimas décadas (Wcisło, 1998; Markus & McBratney, 2001; Cai *et al.*, 2008).

Los elementos que pueden contaminar el suelo son muy variados, desde compuestos orgánicos como hidrocarburos aromáticos hasta metales pesados pasando por pesticidas y otros elementos de síntesis artificial (Alloway, 1995; Flury, 1996; Cai *et al.*, 2008). Entre estos los metales pesados poseen ciertas características que los hacen especialmente problemáticos (véase revisión en Cuizano & Navarro 2008): son tóxicos incluso a concentraciones bajas (1,0-10 mg ml⁻¹), producen efectos negativos a corto y largo plazo, sus diversas formas poseen toxicidad diferencial (el cobre en su paso de forma quelada a forma iónica libre aumenta su toxicidad 500 veces, Glime, 2007), se acumulan a través de la cadena trófica (Khan *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2007) y no se degradan por ningún método, ni siquiera con bio-tratamientos (aunque se pueden emplear algunas técnicas para concentrarlos y retirarlos del medio).

Las explotaciones mineras son una de las principales fuentes de contaminación de suelos por metales pesados (Galán & Romero, 2001). Los desechos de estas actividades, que siguen conteniendo altas cantidades del metal, son almacenados pero pueden pasar al medio por escorrentía (Volke *et al.*, 2005). El aumento de la concentración de metales pesados produce diversas perturbaciones en el ecosistema. Por un lado, afecta al desarrollo, la diversidad y riqueza de especies, por otro también tiene efectos en la dinámica de la materia orgánica al modificar las tasas de descomposición y la mineralización del N (Wong, 2003). Unido a esta contaminación química está la

explotaciones muy bien preservados (Jordá, 2008). En un trabajo anterior (Elvira *et al.*, 2015a, b), ya realizamos una primera valoración de algunas explotaciones mineras de este metal (La Estrella, Fernandito, Chilena y San José).

El cobre como metal pesado y sus efectos en los organismos vegetales

A diferencia de otros metales pesados el cobre se encuentra de forma normal en organismos sanos ya que es un micronutriente esencial que está presente en las metaloenzimas y otras proteínas implicadas en reacciones redox y de transporte electrónico (Nomura & Hasezawa, 2011; Bravo-Gómez *et al.* 2015). En pequeñas dosis cubre los requerimientos de los organismos, sin embargo pasa a ser tóxico cuando aumenta su concentración, en el caso de los vegetales la forma iónica libre (Cu^{2+}) produce toxicidad por encima de $20\text{-}30 \text{ mg Kg}^{-1}$ (Hernández-Colorado *et al.*, 2012).

Las concentraciones de cobre en los tejidos, está relacionado generalmente con la concentración de los suelos aunque en algunos casos puede depender del aporte en el agua que les llegue (Takenaka & Satake, 1991). De forma normal, el cobre en los suelos se puede encontrar en concentraciones de $13\text{-}24 \text{ mg Kg}^{-1}$ (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), aunque el valor regional de referencia para la Comunidad de Madrid es de 20 mg Kg^{-1} (VR90, BOCM, 2006).

La consideración legal de suelo contaminado depende en gran medida del uso, de esta forma los suelos con usos más sensibles a la contaminación (por ejemplo agrícola o forestal) tenemos valores genéricos de referencia de 80 mg Cu Kg^{-1} para la Comunidad de Madrid (BOCM, 2006). Estos valores son los que al superarse suponen un riesgo inaceptable para la salud humana. Sin embargo, para suelos industriales los valores genérico de referencia superan esta cifra 100 veces (BOCM, 2006). Por esta diferencia en la concepción de las autoridades es necesario fijarse en los organismos y en cuando estos se ven afectados para poder deducir si el nivel de cobre está afectando al ecosistema y tener una idea de cómo evoluciona esta situación (Holt & Miller, 2011). Para la contaminación de suelos se suelen usar microorganismos del suelo, microfauna o plantas (tanto vasculares como briófitos), se escogen estos porque al ser organismos no-móviles o poco móviles a gran escala deben soportar o sucumbir a las condiciones locales del suelo (Markert *et al.*, 2003).

En la mayoría de los organismos vegetales la contaminación por metales pesados provoca una reducción o retraso en el crecimiento, e incluso su muerte. Esto se debe a su efecto en los procesos de fotosíntesis, respiración y síntesis de proteínas (Hart & Scaife, 1977; Nomura & Hasezawa, 2011). A escala molecular los metales pesados interactúan con los grupos sulfhídricos de las enzimas y otras macromoléculas (Panda & Choudhury, 2005; Shakya *et al.*, 2008), lo que se traduce en daños en la membrana plasmática y la salida de iones potasio (Brown & Wells, 1990). Además, se produce una disminución de la concentración de clorofila en la célula (Guschina & Harwood, 2002; Panda & Choudhury, 2005; Shakya *et al.*, 2008) que puede conllevar altas tasas de mortalidad.

Los briófitos y el cobre

Para el estudio del cobre y otros metales pesados se suele usar el grupo de los briófitos ya que poseen ciertas características que no tienen otros grupos de vegetales terrestres. En primer lugar, al carecer de cutículas eficaces, presentan una baja resistencia a la entrada de iones metálicos en sus tejidos junto con el agua (Barkman, 1969; Soria 1993). Además, la entrada del cobre se ve favorecida por procesos como la absorción pasiva de cationes, el consumo activo de aniones, la captura de partículas o el intercambio iónico (Puckett, 1988; Shakya *et al.*, 2008). Una vez dentro, los briófitos tienden a impedir la salida de solutos con mecanismos contragradiante, por lo que el cobre se acumula en éstos (Carginale *et al.*, 2004; Shakya *et al.*, 2008).

Una vez en los tejidos, los cationes de cobre quedan inmovilizados por las cargas negativas de la pared celular, por lo que su paso al resto de la célula es muy reducido o se produce muy lentamente (Chettri *et al.*, 1997; Shakya *et al.*, 2008). Esto se ha observado en un musgo metalófilo, *Scopelophila cataractae* (Mitt.) Broth., donde el cobre se acumula principalmente en la pared, y pasa en menor medida al citoplasma y a los cloroplastos (Satake *et al.*, 1988; Satake, 2013). La retención del cobre en la pared como sistema de defensa no es total ni ocurre al mismo nivel en todas las especies (Tyler 1990; Shakya, 2008). En cualquier caso una vez que este metal penetra en el citoplasma afecta a la estructura de la membrana (Panda & Choudhury, 2005) y con ello a los procesos de división por lo que puede limitar la reproducción sexual y asexual al impedir la formación de yemas y la germinación en algunas especies de briófitos (Glime, 2007).

A pesar de estos inconvenientes podemos esperar algún tipo de mecanismo de resistencia frente al cobre, ya que hay especies que crecen en zonas contaminadas. Sin embargo, aunque se supone la existencia de este, su naturaleza y funcionamiento no está clara. A nivel molecular se ve una activación de los mecanismos antioxidantes (Panda & Choudhury, 2005), sin embargo, en cuanto al organismo no se tienen datos.

Debido a estas diferencias en la respuesta, el nivel de tolerancia de los briófitos al exceso de metales es muy variado, tanto entre los diversos grupos como entre las especies que los forman. Así, los briófitos -al igual que otras plantas- se clasifican en varias categorías en relación a su resistencia a los metales pesados. Son sensibles aquellas especies cuya misma supervivencia se ve comprometida, tolerantes las que pueden sobrevivir pero no se encuentran en sus condiciones óptimas), hiperacumuladoras (concentran en sus tejidos altas dosis de contaminantes, de hasta 1000 mg Kg⁻¹ en el caso del cobre: Jara-Peña *et al.*, 2014) y metalófilas (requieren de metales en el sustrato para desarrollarse: Becerril *et al.*, 2007). En el caso de los briófitos existen los denominados “musgos del cobre”, organismos metalófilos que poseen una preferencia por la presencia de este metal en el suelo (Glime, 2007b). Entre éstos se encuentran *Mielichhoferia elongata* Rehmman, *M. mielichhoferi* Wijk & Margad., y diversas especies de *Scopelophila* (Mårtensson & Berggren, 1954; Persson, 1956).

Bioindicación directa e indirecta

Debido a los diferentes tipos de respuesta a los metales pesados antes comentados, es posible observar en los briófitos cambios producidos como respuesta a altas concentraciones cuya entrada no pueden controlar. Estos cambios se dan tanto en los organismos individualmente como en la composición y estructura de las comunidades, ya que algunas especies son más sensibles que otras a los contaminantes (Lepp & Salmon, 1999). Por ello los briófitos se han utilizado durante años para comprobar si hay contaminantes en el medio y cuál es su concentración (Holt & Miller, 2011), lo que se conoce como bioindicación.

Sin embargo, podemos diferenciar dos tipos de bioindicación: la directa y la indirecta (Markert, 2007). Consideramos un organismo bioindicador directo cuando proporciona información cuantitativa de la cantidad de contaminante en el medio a través de la cantidad de este en sus tejidos. Por otro lado, los bioindicadores indirectos nos ofrecen información acerca de la cantidad de contaminante según los efectos que éste produce.

En el caso del cobre, estos efectos pueden ser muy variados (Markert, 2007) y se pueden además producirse a diferentes escalas. Por un lado puede provocar cambios en la organización celular e histológica que pueden manifestarse como modificaciones morfológicas o fisiológicas. Por otro, estas alteraciones tienen efectos a escalas algo mayores ya que también pueden modificarse la estructura de la población y las relaciones interespecíficas (Markert, 2007).

Además, recientemente, está cobrando interés el estudio de las relaciones que los musgos establecen con sus comunidades de epífitos. Aunque aún no se conocen bien, parece que los musgos son capaces de regular su carga de epífitos según sus necesidades nutricionales, en especial de nitrógeno (Rousk *et al.*, 2013). En nuestro estudio anterior sobre briófitos de minas de cobre (Elvira *et al.*, 2015a, b) observamos que la presencia de epífitos era indicativa del mal estado o del grado de afección por perturbaciones o metales en musgos procedentes de explotaciones mineras, y planteamos la posibilidad de incluir estas observaciones como posibles fuentes de datos interesantes en bioindicación indirecta.

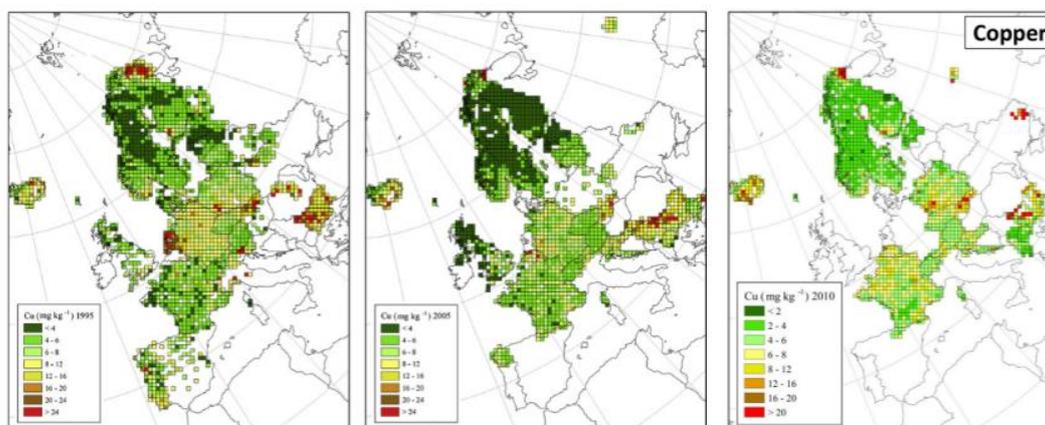


Fig. 2: concentración media de cobre en musgos por cuadrícula EMEP (50 Km x 50Km) en 1995 (izquierda), 2005 (centro) y 2010 (derecha). Los datos del 2010 tienen un límite menor para las clases de color que los de los otros años. Fuente: Harmens *et al.* (2010) y Harmens *et al.* (2015a).

El grupo internacional de investigación europeo ICP Vegetation ha usado la bioindicación directa en planes quinquenales desde 1995 bajo la supervisión de la ONU para comprobar el descenso en Europa (Fig.2) del contenido de metales pesados en la atmósfera, así como para medir la cantidad de estos (Harmens *et al.*, 2010; Harmens *et al.*, 2015a). No obstante, la efectividad de este método se ha puesto en entredicho por diversos sectores de la comunidad científica al considerar que existe una distorsión entre la deposición atmosférica de los contaminantes y la acumulación en los tejidos (Aboal *et al.*, 2010;

Schröder *et al.*, 2010). Las diferencias entre las concentraciones en los tejidos y en el medio van a depender de factores ambientales y de las diferentes especies que se usen (Lepp & Salmon, 1999; Aboal *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2014). Estos autores sostienen que, probablemente la concentración de contaminantes en los tejidos se pueda usar para estimar de forma cualitativa la deposición atmosférica de cadmio y plomo, pero que para el resto de elementos, que no tienen como principal medio de difusión el aire, no deben ser usados (Aboal *et al.*, 2010).

A pesar de las reticencias mostradas en el uso de los musgos como bioindicación directa, no se puede negar el efecto que los metales pesados tienen en estos organismos de modo que la bioindicación indirecta sigue siendo de utilidad, siempre que se tengan en cuenta variables ambientales que puedan modificar el efecto del contaminante (Aboal *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2014) y se sigan protocolos estandarizados (Harmens *et al.*, 2015b; Fernández *et al.*, 2015).

Espece estudiada

El año pasado durante la realización del TFG (Elvira *et al.*, 2015a, b) encontramos un grupo de especies que parecían tolerar bien los niveles altos de cobre en el suelo (Tabla 1). Para comprobar el efecto de la actividad minera en general y del cobre como contaminante en particular escogimos de esta lista la especie *Ptychostomum capillare*

Tabla 1: Listado de especies tolerantes a cobre encontradas en las zonas afectadas de las minas Chilena y Estrella.

Especies tolerantes a cobre
<i>Bryum argenteum</i> Hedw.
<i>Bryum dichotomum</i> Hedw.
<i>Bryum gemmiparum</i> De Not.
<i>Cephaloziella rubella</i> (Nees) Warnst.
<i>Didymodon acutus</i> (Brid.) K.Saito
<i>Grimmia pulvinata</i> (Hedw.) Sm.
<i>Ptychostomum capillare</i> (Hedw.) Holyoak & N. Pedersen
<i>Syntrichia princeps</i> (De Not.) Mitt.
<i>Syntrichia ruralis</i> (Hedw.) F.Weber & D.Mohr var. <i>ruralis</i>
<i>Tortula muralis</i> Hedw. var. <i>muralis</i>
<i>Tortula subulata</i> Hedw.

(Hedw.) Holyoak & N. Pedersen (= *Bryum capillare* Hedw.). Se trata de un musgo acrocárpico de distribución cosmopolita (Shaw & Petersen, 2005), que puede aparecer en múltiples sustratos aunque tiene preferencia terrícola (Dierßen, 2002; Casas-García, & Burgaz, 2002). Se ha documentado en numerosas ocasiones la resistencia de esta especie a los contaminantes así como su tolerancia a la perturbación del suelo y es habitual encontrarlo en muestreos realizados en medio urbano (Mazimpaka *et al.*, 1988; Soria, 1993; Sabovljević & Grdović, 2009). La especie es capaz de desarrollarse en zonas con altas concentraciones de contaminante y por lo tanto es una buena candidata para el estudio de los efectos del cobre.

Importancia de la remediación de suelos

Al igual que otras plantas los briófitos modifican la estructura del suelo (Angers & Caron, 1998). Al atravesarlo con sus estructuras subterráneas (rizoides) favorecen la estabilización de partículas del suelo. También contribuyen al equilibrio en el régimen hídrico del suelo debido a su capacidad de retención hídrica. Además, pueden tener importancia para los procesos biogeoquímicos ya que excretan sustancias específicas y establecen interacciones con otros organismos de la rizosfera (Lindo & Gonzalez, 2010). El uso de las plantas y sus organismos asociados para neutralizar los contaminantes ambientales y sus efectos se denomina fitorremediación (Cunningham & Ow, 1996). La fitorremediación de los suelos con metales pesados se puede realizar con dos acciones complementarias, la fitoestabilización y la fitoextracción. La fitoestabilización consiste en el crecimiento de plantas tolerantes a la contaminación que bloqueen la movilidad de los contaminantes, con ello se consigue estabilizar el terreno y modificar las características del suelo de tal manera que permite la colonización de otras plantas (Wong, 2003). Por otro lado la fitoextracción consiste en la traslocación del contaminante a los tejidos vegetales, para ello se suelen usar los denominados hiperacumuladores (Wong, 2003), que hemos comentado en el apartado “Los briófitos y el cobre”. Durante la fitoextracción algunas plantas pueden retirar contaminante hasta niveles lo suficientemente bajos para considerar el medio poco contaminado (Dickinson & Lepp, 1997). Hay que tener en cuenta que en muchos casos se usan cultivos u organismos modificados para la fitorremediación. Sin embargo, es más recomendable el uso de especies silvestres para procurar la recuperación de las comunidades naturales (Wong, 2003).

Los briófitos no se han tenido en cuenta para la fitorremediación por su pequeño tamaño, sin embargo tienen ventajas intrínsecas a su biología. En primer lugar se diferencian de los otros representantes vegetales en que están presentes en la etapa de costra biológica (Casillo-Monroy *et al.*, 2011). Esta etapa pionera de la vegetación tiene una gran importancia en la formación, protección y dinámica del suelo, desde el aporte de materia orgánica hasta favorecer la agregación de partículas (Belnap & Lange, 2003). Otra razón para el uso de briófitos es su capacidad de reviviscencia por su condición de criptógamos que les permite resistir periodos adversos como la sequía estival del mundo mediterráneo (Sabovljević *et al.*, 2007).

Es cierto que su uso quedaría restringido casi totalmente a la fitoestabilización por la dificultad para “cosechar” el material vegetal para reciclarlo en el proceso de fitoextracción (Wong, 2003). Sin embargo, la dinámica de sus comunidades son muy rápidas por lo su desarrollo y evolución se produce a una escala más rápida que en plantas vasculares (Belnap *et al.*, 2006). Además, se conoce relativamente bien qué especies son habituales en ambientes urbanos y contaminados y por lo tanto con elevada tolerancia a la contaminación y la perturbación (al menos urbana). Algunos buenos ejemplos de estas especies tolerantes presentes en la flora ibérica son *Bryum dichotomum*, *Syntrichia ruralis* y nuestra especie de estudio *Ptychostomum capillare* (Ballesteros & Ron, 1985; Mazimpaka *et al.*, 1988; Rams *et al.*, 2000; Oliva Alonso, 2001).

Hipótesis y objetivos

Suponemos que el cobre afectara a *Ptychostomum capillare* en diferentes aspectos de su biología. A escala celular e individual esperamos muerte celular en los casos más graves, así como modificaciones morfológicas en los tejidos, ralentización en el crecimiento y efectos negativos en las estructuras de reproducción sexual y asexual. Por otro lado, a escala de comunidad esperamos que produzca un empobrecimiento de las comunidades en las que encontremos a *P. capillare* y una reducción en la capacidad de protegerse frente a patógenos o parásitos. Sin embargo, debe haber algún mecanismo por que permita a esta especie crecer en terrenos muy contaminados por cobre. Si este mecanismo existiera, nos planteamos la utilidad de *P. capillare* como bioindicador, ya que al evitar la entrada de contaminantes habría una distorsión respecto al nivel de cobre en el suelo.

Al ser la actividad minera una perturbación química y física suponemos que habrá otros factores que afecten a su crecimiento más allá del aumento de la concentración de cobre. Por último nos planteamos la capacidad de este musgo para la recuperación de los suelos contaminados. Por lo tanto los objetivos que se plantean en este trabajo son:

- Estudiar en una mina representativa el efecto de la contaminación de cobre en *Ptychostomum capillare* a diferentes escalas:
 - Variación del tamaño poblacional y la estructura de la comunidad
 - Daño celular y tisular en las estructuras vegetativas
 - Efectos en el crecimiento y el desarrollo
 - Daño en las estructuras de reproducción sexual y asexual
- Comparar los efectos de la contaminación por cobre con otros factores como la erosión, la degradación de la estructura del suelo o el porcentaje de materia orgánica y humedad
- Estudiar las posibles estrategias de resistencia que explique su comportamiento frente a este contaminante
- Discutir su utilidad en la bioindicación directa comparando el contenido de cobre en los tejidos con el presente en el suelo
- Evaluar la utilidad de esta especie en la remediación de terrenos contaminados por cobre dada su aparente resistencia a este metal

Material y métodos

Elección de la zona de estudio y de la especie

Entre las explotaciones mineras abandonadas más localizables y accesibles, elegimos la mina La Estrella por ser, de las estudiadas durante el trabajo de fin de grado, la que presentaba diferencias más claras en cuanto a niveles de cobre en las zonas consideradas más y menos afectadas (hasta 23 veces superior en la afectada, Tabla 2) y, a la vez una abundancia relativamente alta de briófitos. La mina

Chilena, que también presentaba diferencias en cobre apenas proporcionaba muestras y era imposible hacer un control en las inmediaciones. Al seleccionar las zonas de muestreo se intentó evitar la presencia de arbustos de gran tamaño que pudieran modificar las condiciones del suelo y aportar una humedad diferencial a la del resto de la zona. A excepción de una de las parcelas (la parcela 8, en el área muy afectada de la mina: véase Tabla 4), todas tienen una pendiente reducida.

Se escogió la especie de musgo *Ptychostomum capillare* por ser abundante en todas las minas y presentarse tanto en zonas no afectadas como en zonas con alta contaminación por cobre (Tabla 3). Dado su tamaño, relativamente grande, nos permitía una mayor cantidad de material vegetal para los análisis posteriores. Además, tiene la ventaja de

producir yemas rizoidales como sistema de reproducción vegetativa. De hecho el color

Tabla 3: Catálogo de especies de la mina Estrella.

- Bryum dichotomum* Hedw.
- Bryum gemmiparum* De Not.
- Cephaloziella rubella* (Nees) Warnst.
- Didymodon acutus* (Brid.) K.Saito
- Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm.
- Ptychostomum capillare* (Hedw.) Holyoak & N. Pedersen
- Syntrichia princeps* (De Not.) Mitt.
- Syntrichia ruralis* (Hedw.) F.Weber & D.Mohr var. *ruralis*
- Tortula muralis* Hedw. var. *muralis*
- Tortula subulata* Hedw.
- Riccia gougetiana* Durieu & Mont. var. *gougetiana*
- Tortella squarrosa* (Brid.) Limpr.

Tabla 2: Contenido de metales en sustrato afectado por los residuos mineros de la mina Estrella (Madrid). Análisis realizado mediante digestión (HNO₃, HCl, HF, H₂O₂ y H₂O, a 110°C durante 3 horas) y TXRF.

	Concentración Cu (ppm)	
	Afectada	No afectada
Al	58,9	59,3
Fe	30,230	28,952
Cu	36,048	1,679
Zn	0,411	0,073
As	0,085	0,386
Pb	0,025	0,588



Fig. 3: Pie de *Ptychostomum capillare* con restos de los rizoides donde se puede apreciar el tamaño y aspecto de las yemas rizoidales.

rojo intenso y el gran tamaño de las yemas es un carácter diagnóstico de esta especie (Fig.3). Es también, una especie relativamente fácil de identificar en campo por sus característicos filidios acabados en un pelo y enrollados en espiral cuando el musgo está seco.

Dado que uno de los objetivos consiste en investigar cuánto y cómo absorbe el cobre la especie seleccionada, necesitamos una especie de referencia que lo absorbe activamente. Para ello utilizamos *Scopelophila cataractae*, una especie que se caracteriza por requerir concentraciones elevadas metales pesados (principalmente cobre) en el medio para poder desarrollarse. Las muestras usadas se guardaron en el herbario de MA-UAM con las siguientes etiquetas:

Scopelophila cataractae Mitt. (Borth.)
Japón, Prefectura de Yamagata
Yamagata-shi, Uesugi-jinja
Leg.: Belén Estébanez. 21/08/2015
Det.: Belén Estébanez.

Scopelophila cataractae Mitt. (Borth.)
Japón, Prefectura de Iwate
Complejo de templos de Hiraizumi, bajo el tejado
de una casa particular, cerca del teatro Noh.
Leg.: Belén Estébanez. 23/08/2015
Det.: Belén Estébanez.

Área de estudio

El muestreo se realizó en el entorno de la mina La Estrella (40°56'25,5"N - 3°37'54,7"O, a 1117 m) los días 20, 21 y 22 de enero de 2016. Esta mina se encuentra en la Sierra Norte de la Comunidad de Madrid, en el término municipal de Lozoyuela-Navas-Sieteiglesias. Está situada a 200-250 metros de la autovía A-1. Comenzó su explotación entre 1890 y 1899 (Domínguez, 1890; Jordá, 2008), y fue abandonada en torno a 1965. En ella se extraía cobre, plomo y wolframio (Jordá, 2008). El mineral explotado en las minas de cobre de la zona (Garganta de los Montes y el Cuadrón) es la calcopirita. La mina de estudio comparte características geológicas con el resto por lo que es de esperar que también extrajeran este mineral (Jordá, 2008). La superficie afectada por la minería es de 4514 m², mientras que las escombreras solo ocupan 1633 m² (Jordá, 2008).

El área de estudio se sitúa sobre una pendiente suave en sentido noroeste-sureste. El paisaje en el que se engloba es un encinar abierto (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), encontramos matorral formado por *Cistus ladanifer*, *Cistus laurifolius* y *Halimium*

ocymoides. El sustrato en el área de estudio lo identificamos como formado por arenas arcósicas y presenta un alto grado de pedregosidad. El suelo es predominantemente pardo con presencia de materiales rojizos, posiblemente debido a la presencia de óxidos e hidróxidos de hierro, excepto en algunas zonas más claras sin presencia de vegetación.

En la zona noroeste de la mina se encuentra una construcción en ruinas con una coloración azul-verdosa en las paredes que evidencia posibles restos de cobre o malaquita/calcopirita almacenados tras la extracción o el tratamiento. En general la propiedad se encuentra altamente perturbada, y actualmente se usa como escombrera. Se observan a su vez rodadas de vehículos (seguramente camiones) que indican una perturbación constante del terreno.

Zonación

En la mina la Estrella y alrededores se delimitaron 9 parcelas de 1 m² representativas de un gradiente de contaminación por cobre y perturbación. La elección de las parcelas se hizo mediante aproximación visual de la cantidad de cobre en el suelo. Se consideró que una zona tenía contaminación por cobre cuando se encontraron restos de color azul-verdoso en el sustrato, o cuando por la posición respecto al foco de contaminación era plausible esta suposición. Para catalogar una parcela como perturbada se tuvo en cuenta sobre todo la presencia de piedras sueltas o aportes de cascotes: su abundancia era indicativa del grado de perturbación.



Fig. 4: Parcelas muestreadas en la mina La Estrella: la intensidad del color y la numeración indican aumento del contenido de cobre observado *in situ*.

Se eligieron 2 parcelas cerca del foco de contaminación (9 y 7 de la Fig. 4), 2 a distancias intermedias (8 y 6 de la Fig. 4), 2 lejos del foco pero dentro del área de explotación de la mina (5 y 4 de la Fig. 4) y 3 parcelas fuera de la zona de influencia de la mina (3,2 y 1 de la Fig. 4). En cuanto a la perturbación, se escogieron 2 parcelas poco perturbadas, una a distancia intermedia dentro del gradiente de cobre y una fuera de la zona de influencia (6 y 3 de la Fig. 4). En la Tabla 4 aparecen descritas de menor cantidad aparente de cobre a mayor (Fig.4):

Tabla 4: Descripción y localización de las parcelas del gradiente.

Nº	Cu	Per.	Coordenadas	Observaciones
1	-	+	40°56,372'N; 3°38,019'O	Junto al camino, sin restos de cobre
2	-	+	40°56,401'N; 3°38,062'O	Bajo una encina, cerca de la mina pero pendiente arriba, sin restos de cobre
3	-	-	40°56,432'N; 3°37,984'O	En una pradera, con abundantes excrementos de ganado, sin restos de cobre
4	+	+	40°56,362'N; 3°37,956'O	Junto al camino, con pequeñas encinas, apenas restos de cobre
5	+	+	40°56,343'N; 3°37,943'O	En el extremo inferior de la pendiente, con algunas piedras azul-verdosas (con depósitos de cobre)
6	+	-	40°56,359'N; 3°37,985'O	En un promontorio, mejor desarrollado, más vegetación. Con algunas piedras azul-verdosas
7	+	+	40°56,361'N; 3°37,990'O	Muy perturbada por el paso de maquinaria, con restos evidentes de cobre
8	+	+	40°56,357'N; 3°37,986'O	Elevada pendiente y arbustos secos. Gran cantidad de restos de cobre
9	+	+	40°56,357'N; 3°37,999'O	Con escombros y muchos restos de color azulado verdoso, posibles restos de cobre. Gran cantidad de piedras con restos de cobre

Medidas tomadas

En cada parcela se tomaron datos de porcentaje de cobertura vegetal (de musgos, líquenes, hepáticas, vasculares leñosas y herbáceas) y la pedregosidad del suelo. Se recogió una muestra de suelo por parcela que estaba constituida por 5 sub-muestras (4 en las esquinas y uno en el centro) que se mezclaron para homogeneizar la muestra. Las muestras fueron tomadas en los 5 primeros centímetros de suelo.

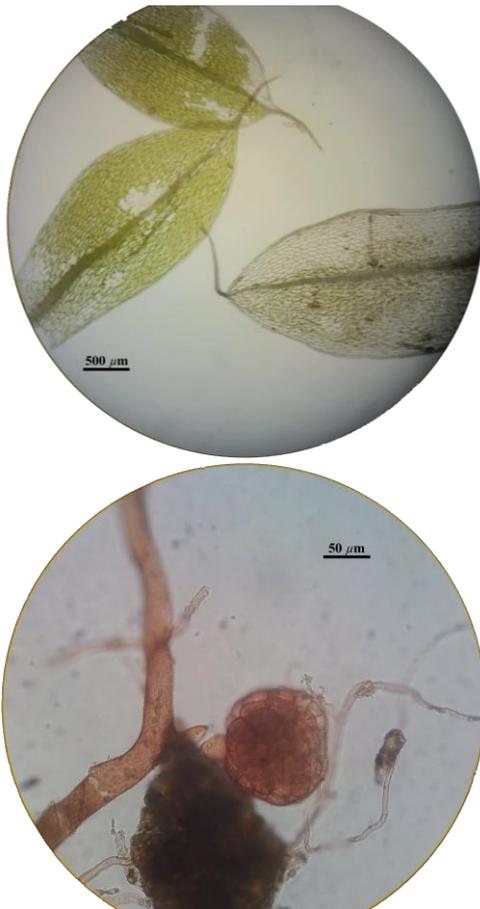


Fig. 5: Filidial con células hialinas (arriba) y yema rizoidal (abajo). Estas son algunas de las variables medidas en *Ptychostomum capillare*

En cada parcela de 1 m² se midieron, geolocalizaron y recogieron todas las céspedes, un total de 462, de *Ptychostomum capillare*. Y en cada uno de los céspedes se tomaron medidas de sus dimensiones (la profundidad no se recogió, ya que el método de medición no era adecuado para musgos terrícolas con parte basal muy degradada). También se apuntó qué especies aparecían compartiendo el área ocupada por este musgo, así como el porcentaje que ocupaban (Tabla 5).

En una selección representativa de los céspedes de *P. capillare* se midieron además diversas variables en brotes individuales (Tabla 5). Para elegir la submuestra de céspedes, se dividieron las muestras en diferentes clases de tamaño según los criterios que aparecen a continuación: 1: <1,5 cm², 2: <4,5 cm², 3:

<13,5 cm², 4: <40,5 cm² y 5: >40,5 cm². Las medidas en brotes individuales se tomaron en el 10% de las almohadillas de cada clase. Para optimizar el tiempo de trabajo, algunas medidas de las medidas se omitieron en dos de las parcelas (1 y 4) pues, en los análisis de suelo, mostraban características semejantes a las parcelas 2 y 5 respectivamente.

Tabla 5: Variables medidas en las diferentes parcelas

Nombre de la variable		Descripción
Porcentaje de otros organismos	1	Parte de la población ocupada por otra especie. NB: Se ha considerado invasor todo lo que reduzca la densidad de un césped definido de <i>Ptychostomum capillare</i> , incluyendo ocasionalmente suelo y piedras
Área real (cm ²)	1	Resultado de restar al área total el porcentaje de otros organismos
Nº invasoras	1	Número de especies diferentes que se introducen en los céspedes
Altura del eje	2	Medido desde la aparición del primer rizoide hasta el ápice del caulidio, en el pie representativo de mayor altura
Amarilleamiento	2	Porcentaje de pies afectados dentro de la población.
Amarilleamiento.pie	2	Porcentaje medio de tejido dañado en cada pie.
Densidad de brotes	3	Número de ejes por cm ² .
Frecuencia de yemas rizoidales	3 ^a	Número de ejes en los que aparece una o más yemas rizoidales (Fig. 5)
Nº de yemas por eje	3 ^a	Número de yemas que aparecen en cada eje (Fig. 5)
Tamaño de las yemas	3 ^a	Tamaño en µm de las yemas encontradas (Fig. 5)
Degradación del margen	3 ^b	Porcentaje del margen que se encuentra roto o con evidencias de degradación
Degradación del margen	3 ^b	Porcentaje de los filidios medidos que están afectados
Reproducción sexual	3 ^a	Número de esporofitos, anteridios o arquegonios en los ejes seleccionados
Células hialinas	3 ^b	Porcentaje de la lámina que tiene células hialinas (sin cloroplastos, Fig. 5)
Células hialinas	3 ^b	Porcentaje de los filidios medidos que están afectados (Fig. 5)
Afección por epífitos	3 ^b	Porcentaje de los filidios medidos que están afectados
Cobertura de epífitos	3 ^b	Porcentaje de la lámina cubierto por algún tipo de epífito (alga, hongo etc.)
1: medido en todas los céspedes de las 9 parcelas, n= 462 2: medido en todas los céspedes de 7 de las parcelas n= 367 3: medido en el 10% de cada clase de tamaño para las 7 parcelas n= 55 a: 5 medidas por césped, se trabaja con la media (5 ejes) b: 15 medidas por césped se trabaja con medias (5 ejes, 3 filidios por eje)		

Análisis del suelo

Se reservó una porción de la muestra tomada en campo para medir la humedad. El resto se dejó secar al aire y se pasó por un tamiz de 2 mm de luz para separar la fracción suelo o tierra fina (< 2 mm de diámetro de partícula) de la fracción gruesa (> 2 mm). Se pesaron ambas fracciones para obtener el % de elementos gruesos.

La humedad higroscópica (W) se determinó manteniendo las muestras de suelo traídas del campo en estufa 105°C hasta alcanzar un peso constante. La humedad higroscópica W se calcula por la pérdida de peso de la muestra desecada a través de la fórmula propuesta por Kaúrichev *et al.* (1980): $\frac{gh-gs}{gh} * 100 = \text{humedad higroscópica (\%)}$, donde gh representa el peso (en gramos) del suelo húmedo y gs el peso (en gramos) del suelo seco.

En las muestras secadas y tamizadas se realizaron las siguientes determinaciones:

- pH: se determinó en agua destilada (pH H₂O) y en una disolución KCl 1M (pH KCl) ambas en una relación 1:2,5. Las mediciones se realizaron en un pHmetro Thermo ORION Model 720.
- Textura: se obtiene la distribución de los tamaños de partículas minerales del suelo. Determinando los porcentajes en fracción arena (2mm-50µm), fracción limo (50µm-2µm) y fracción arcilla (<2µm). Se determinó mediante el método Boyoucos (MAPA, 1994) con dispersión previa usando una mezcla de hexametáfosfato sódico y carbonato sódico, a pH 8,5 en proporción 1:1.
- Materia orgánica: Se realizó en una muestra pasada por tamiz y pulverizada en mortero de ágata. Se determinó usando el método Walkey Black (1947), basado en la oxidación del carbono orgánico oxidable con dicromato potásico en medio ácido. Posteriormente se valoró el exceso de dicromato con sal ferrosa (Mohr, sulfato ferroso amoniacal), utilizando difenilamina como indicador (MAPA, 1994).
- Nitrógeno: Se realizó tras pasar por el tamiz de 2 mm y por el mortero de ágata. Se llevó a cabo con una variante de la técnica Kjendahl mediante la cual la muestra de suelo fue digerida con ácido sulfúrico concentrado y un catalizador (Cu y Se) que facilita la transformación del nitrógeno en ion amonio. Se digirió en baño de arena con rampa de calentamiento hasta la total decoloración del suelo. A continuación el ion amonio fue determinado con electrodo selectivo de amonio (*ammonia electrode*) Orion 9512HPBNWP. Este electrodo requiere la extracción del amoniaco gaseoso mediante la adición de un compuesto altamente alcalino (ajustador de fuerza iónica, $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Se calibró el electrodo con soluciones patrón de amonio de 10 y 100 ppm.

- Contenido total de cobre: se determinaron en la muestra tamizada, pulverizada en un mortero de ágata, y posteriormente sometida a digestión con agua regia, es decir, una mezcla de HCl y HNO₃ (3/1 v : v; ISO 11466, 1995). El extracto fue medido por espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin-Elmer Analyst 800.
- Contenido de cobre y fosforo extraíbles: se analizó en la muestra de suelo tamizada. La extracción se realizó con la disolución estándar Mehlich 3, propuesta por Mehlich en 1984 (Rodríguez *et al.*, 2005). Este reactivo contiene CH₃COOH (0,2 M), NH₄NO₃ (0,25 M), NH₄F (0,015 M), HNO₃ (0,013 M) y EDTA (0,001 M) a un pH de 2,5. Ofrece la ventaja de poder extraer tanto macro (P, Ca, Na, K y Mg) como micronutrientes (Cu, Zn y Mn) (Rodríguez *et al.*, 2005). Puede usarse en un amplio rango de pH y extrae una fracción similar a la biodisponibilidad de estos elementos para las plantas (Wang *et al.*, 2004).

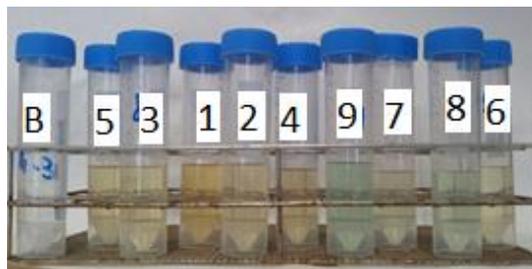


Fig. 6: Extractos de Mehlich 3, en los tubos de las parcelas 8 y 9 se puede ver un color azulado indicativo de la gran cantidad de cobre extraíble del suelo. B= blanco de medición.

En este extracto (Fig. 6) se determinó el cobre por espectrofotometría de absorción atómica mediante el equipo Perkin-Elmer Analyst 800. La concentración de fosforo extraíble en Melhich 3 se determinó en un fotocolorímetro (Photoanalyzer D-105 DINKO), mediante medida de la concentración del complejo de color azul formado por la reducción con ácido ascórbico del fosfomolibdato obtenido cuando el molibdato amónico (azul de molibdato, Duval) reacciona con el fosforo en medio ácido (MAPA, 1994)

Contenido de cobre en tejidos

Se separaron y pulverizaron 0,2 gramos de las parcelas 3, 6, 8, 9 y de *Scopelophila cataractae* (de la muestra recolectada en Uesugi-jinja, Yamagata, Japón). La digestión se llevó a cabo con agua regia, a ebullición durante 2 h en baño de arena. Se le dio con un pretratamiento de 16 h con dicha mezcla ácida a temperatura ambiente. El extracto fue medido por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer Analyst 800).

Las pruebas histoquímicas se realizaron siempre sobre tres muestras, una extraída de la parcela más contaminada, otra de la parcela control, fuera del área de explotación de la mina (control negativo) y otra, de la especie *Scopelophila cataractae* (musgo metalófilo tomado como control positivo), sobre la muestra tomada en la localidad de Hiraizumi, Iwate, Japón.

Para identificar el cobre en los tejidos se aplicó el test del ácido rubeánico de Bancroft & Stevens (1982) modificado. Se preparó una disolución *stock* de ácido rubeánico 0,1% en etanol absoluto. Para la prueba, se tomó 2,5 de esta solución y se mezcló con 50 ml de acetato sódico 10% en disolución acuosa. En la muestra incubada a 37 °C, se detecta al microscopio el cobre presente como precipitados de color verde oliva-negruzco. La incubación del protocolo original (8 h) resultó ser insuficiente para nuestras muestras, posiblemente por el grosor (un mínimo de 20 µm en lugar de 1 µm de las secciones para las que lo proponen los autores). Resolvimos dejar durante más tiempo la muestra en incubación (2 días).

Para comprobar la posible presencia de un mecanismo de exclusión de cobre mediante barreras de mucílago o ceras, se realizaron pruebas histoquímicas para ambos tipos de compuestos. Para mucílago se emplearon los tests con rojo de rutenio (0,01% acuoso en presencia de EDTA 50 mM, a pH 8-9, 1 h (McFarlane *et al.*, 2014) y con azul Alcian 1% en ácido acético 3% acuoso, 2-5 minutos (Kremer *et al.*, 2004). Para la detección de ceras se usó el test de Sudan black B, saturado en etanol al 70%, sumergiendo las muestras durante 1 minuto, y diferenciándolas en etanol al 50%.

Para comprobar si el cobre se retiraba al eliminar las barreras externas (mucílago o ceras) se lavaron algunas muestras en hipoclorito sódico al 1% durante 30 min a 37° C para limpiar el mucílago, y en cloroformo puro durante 15 min para eliminar las ceras (Proctor, 1979).

Las pruebas histoquímicas se comprobaron con análisis con sonda de energía dispersiva de rayos X acoplada a microscopía electrónica de barrido (MEB-EDAX). Se tomaron muestras de *Ptychostomum capillare* de la parcela 9 (la de mayor riqueza en cobre), y de la parcela 3 (el control fuera del área de la mina), así como de la población de *S. cataractae* de Hiraizumi (Iwate, Japón), como referencia metalófila. De cada una se prepararon dos sub-muestras, una sin tratamiento de lavado, y otra con eliminación de mucílago y ceras como se ha expuesto arriba. Cada sub-muestra, seca y montada en

portamuestras con adhesivo de carbono, se recubrió con una capa de ca. 70 nm de oro en un sputter Quórum, Q150T-S, y se observó en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N operando a 20 kv, con un ESED (*environmental secondary electron detector*) acoplado a un analizador por energía dispersiva de rayos X de Oxford Instruments, modelo INCAx-sight . En cada uno de los portas se separaron partes apicales, con tejidos vivos, y partes basales, muertas, de la muestra. Las observaciones y análisis MEB-EDX se realizaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid.

Metodología estadística

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS y Past3 y R.

Tamaño poblacional: se analizaron gráficamente las formas de la distribución de tamaños poblacionales. Debido a que los datos presentaban un importante sesgo en la distribución se realizó una transformación logarítmica que permitiese comparar los tamaños medios entre parcelas (Fig. 7)

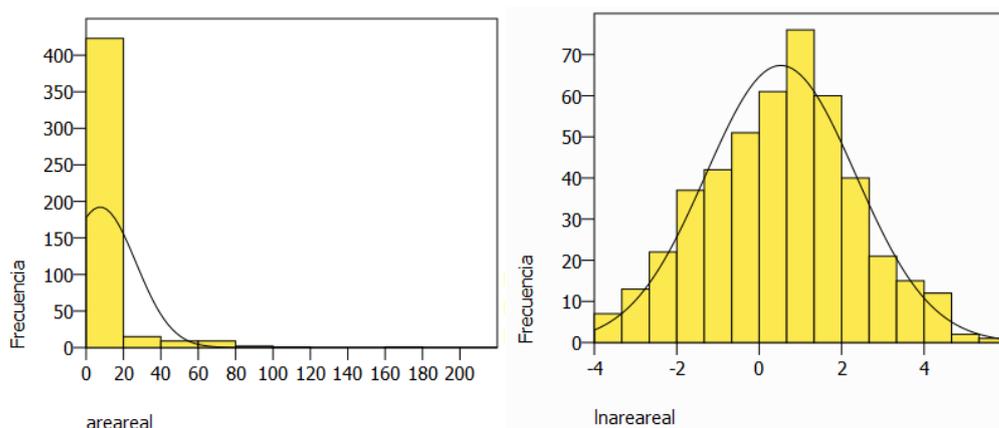


Fig. 7: Ejemplo de la forma de la distribución de los tamaños de los céspedes en la parcela 8. A la izquierda aparece el gráfico de frecuencias en cm^2 (sin transformar) y a la derecha el gráfico de frecuencias del logaritmo del tamaño.

En primer lugar se realizó un análisis de ordenación discriminante LDA, un método de reducción de dimensiones “informado”. En cierto sentido este tipo de análisis es similar a la ordenación ya que se centra en reducir en número de dimensiones y permite trabajar con varias variables respuesta de forma simultánea. Sin embargo, difiere de otras técnicas de ordenación en que el objetivo del LDA es encontrar la combinación de variables que maximiza las diferencias entre grupos de muestras conocidos a priori. Para este estudio

se empleó como unidad de análisis cada uno de los céspedes en los que se midieron todas las variables que se consideraron características de su estado y desarrollo (véase Tabla 5). Además, se empleó la parcela como variable de agrupación o clase, de modo que el análisis encontrase la combinación de variables características que mejor separaba las parcelas entre sí. *A posteriori* se correlacionaron mediante una r de Pearson los dos ejes principales del análisis LDA con las variables de análisis de suelo de las parcelas (contenido en cobre, cantidad de materia orgánica, etc. etc. Tabla 7 a y b). Este último análisis tiene como objetivo identificar los factores que se relacionan mejor con las diferencias entre parcelas.

Adicionalmente, se estudiaron las diferencias entre parcelas mediante análisis univariantes de todas las variables de estado una a una. Inicialmente, se sospechaba que el tamaño de los céspedes podía afectar a las medidas por lo que se realizó un primer análisis en el que se introdujo la interacción con la variable área transformada (\ln del área) en las comparaciones. Sin embargo, en ningún caso se observó que el efecto de la interacción fuese significativo por lo que se descartó el efecto de la interacción. Por lo tanto las comparaciones se realizaron mediante un ANOVA de un factor. En los casos en los que se encontraron diferencias significativas intra-grupos se realizó además un análisis de comparaciones múltiples o post-hoc con una corrección de Tukey. En todos los casos se analizaron los residuos para comprobar que se cumplían las asunciones de linealidad, normalidad y homocedasticidad.

Resultados

Cobertura vegetal y pedregosidad

Las parcelas tenían un bajo porcentaje de leñosas, con una cobertura que supera el 10% solamente en las parcelas 6 y 8. Las herbáceas eran muy abundantes (entre el 40-50%), excepto

Tabla 6: Porcentaje de cobertura vegetal y pedregosidad

	Leñosas	Herbáceas	Líquenes	Musgos	Hepáticas	Pedregosidad
1	<1	40	10	15	0	10
2	<5	50	<5	50	0	5
3	0	>95	<1	50	0	0
4	0	50	15	15	20	<1
5	<1	45	<5	20	80	10
6	15	20	50	30	0	5
7	0	20	<1	<5	0	<5
8	12	<1	<1	30	0	40
9	0	40	<1	15	0	25

en la parcela 8, donde no llegan al 1% (Tabla 6). La parcela con mayor cobertura de líquenes fue la 6 (con un 50%). Solo aparecieron hepáticas (*Riccia gougetiana* Durieu & Mont. var *gougetiana*) en las parcelas consideradas lejanas al foco de contaminación, aunque dentro del área de la mina (parcelas 4 y 5). En general las parcelas más cercanas a la construcción tenían un porcentaje de pedregosidad mayor (Tabla 6). La única parcela no pedregosa fue la tomada como control, fuera del área de perturbación de la mina (parcela 3).

Análisis de suelos

En general las variables ligadas al suelo aumentan o disminuyen en el gradiente de cobre salvo las parcelas con menor contenido en cobre, que en términos generales tienen mayor fracción gruesa y humedad, menor fracción limosa y mayor arcillosa. En cuanto al pH las parcelas con menor contenido en cobre se caracterizaron por tener pH más bajos. Por último, las parcelas con menor contenido en cobre presentaron mayor cantidad de materia orgánica, nitrógeno y contenido relativo de carbono (porcentaje y contenido relativo al carbono). Sin embargo, las parcelas 3 y 6 que se seleccionaron por los bajos niveles de perturbación del suelo como control del efecto de la perturbación (la 3 sin cobre y la 6 con un alto contenido de este metal) mostraron características distintivas discordantes con el patrón general. (Tablas 7a y b). En concreto la parcela 3 tiene un mayor contenido en elementos gruesos y más humedad que las parcelas con contenidos cercanos de cobre. Mientras que, la parcela 6 tiene el doble de humedad y materia orgánica que el resto de

parcelas. Los suelos de las parcelas 3 y 6 presentaban dos horizontes en los primeros 5 centímetros. El más superficial de color oscuro, presumiblemente por la cantidad de materia orgánica no aparecía en el resto de parcelas, en estas no se diferenciaban horizontes. Estas son las parcelas tomadas.

Tabla 7a: Variables de suelo por parcela según la concentración de cobre apreciado en campo. Recoge la granulometría (fracción fina y gruesa, y porcentaje de elementos gruesos), humedad, textura (fracción arena, limo y arcilla) y pH.

	Frac. fina (g)	Frac. gruesa (g)	% gruesos	Humedad (%)	Fracción (%)			pH H2O	pH KCl
					Arena	Limo	Arcilla		
1	708,7	359,5	33,65	14,57±0,61	76,80	8,76	14,44	5,93±0,01	4,62±0,00
2	653,3	249,9	27,67	14,93±0,18	80,90	9,03	10,07	5,96±0,11	4,93±0,01
3	531,4	359,5	40,35	18,18±0,60	64,57	12,24	23,19	6,08±0,06	4,96±0,03
4	707,2	99,7	12,36	14,83±0,28	82,95	8,14	8,91	5,93±0,00	4,95±0,08
5	659,9	95,4	12,63	13,69±0,44	81,71	8,94	9,35	5,91±0,03	4,76±0,06
6	892,5	298,2	25,04	24,45±0,78	71,06	9,48	19,46	6,40±0,03	5,47±0,04
7	936,6	287,5	23,49	10,52±0,45	79,73	8,94	11,33	5,94±0,01	5,01±0,02
8	1135,6	333,2	22,69	8,94±0,22	79,10	9,12	11,78	6,29±0,16	5,59±0,06
9	555,1	176,7	24,15	10,04±0,11	82,23	7,69	10,08	7,16±0,16	6,67±0,15

Tabla 7b: Variables de suelo por parcela según la concentración de cobre apreciado en campo. Recoge la materia orgánica, contenido de nitrógeno, fósforo asimilable y cobre total (AR) y asimilable (m3).

	Mat. Org. (%)	N (%)	C (%)	C/N	P (mg P Kg ⁻¹)	Cu AR (mg Cu Kg ⁻¹)	Cu m3 (mg Cu Kg ⁻¹)
1	3,52±0,43	0,11±0,02	2,04	18,651	54,90±0,00	11,88±0,67	2,11±0,25
2	4,62±0,28	0,12±0,01	2,68	21,583	41,20±0,00	12,50±1,48	1,50±0,11
3	4,38±0,13	0,12±0,02	2,54	20,552	20,60±0,00	15,35±0,21	2,11±0,04
4	3,32±0,24	0,08±0,00	1,92	24,224	32,20±0,00	54,48±18,07	8,21±0,20
5	4,29±0,85	0,12±0,02	2,49	21,387	25,50±0,00	106,13±3,92	24,61±3,68
6	6,77±0,28	0,25	3,92	15,699	15,30±0,00	184,45±9,55	43,55±6,31
7	3,22±0,09	0,06±0,01	1,87	31,681	0,00±0,00	464,95±54,45	200,56±20,86
8	1,52±0,44	0,05±0,01	0,88	17,148	1,83±0,00	1651,28±321,13	615,31±26,87
9	3,12±0,14	0,07±0,00	1,81	25,112	5,00±0,00	8756,28±223,91	1967,81±223,4

En cuanto a la textura todas las parcelas tienen una composición mayoritariamente arenosa. Sin embargo, las parcelas 3 y 6 contienen un mayor porcentaje de arcilla que las aleja del grupo formado por el resto de parcelas en el triángulo de texturas (Fig. 8).

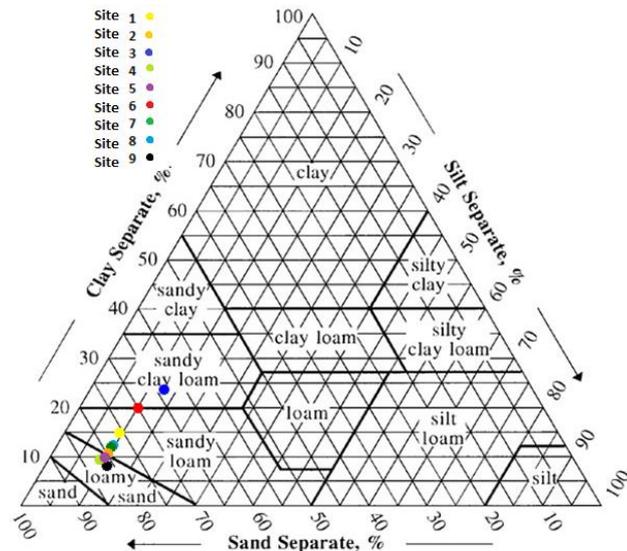


Fig. 8: Triángulo de texturas del suelo. Los puntos de colores representan las distintas parcelas. La mayoría de las parcelas aparecen en la esquina correspondiente a un mayor porcentaje arenoso. Sin embargo, las parcelas 3 y 6 se alejan hacia un mayor contenido en arcilla.

El contenido de cobre en el suelo alcanza 8756,275 mg Cu Kg⁻¹ en la parcela 9, esto es 4,44 veces superior al de la parcela 8 y casi 19 veces mayor al de la

parcela 7 (Fig. 9, Tabla 7b). Las parcelas de la mina más alejadas de la zona más afectada (parcelas 4 y 5) tienen niveles de 54,475 y 106,125 mg Cu Kg⁻¹. Este último es 10 veces superior a las parcelas situadas fuera de la zona de influencia de la mina. Si comparamos con la fracción de Cu asimilable, las proporciones son similares, aunque la parcela 9 no destaca tanto del resto (Fig. 9). Es, con 1967,81 mg Cu Kg⁻¹, solo 3,2 veces mayor a la parcela 8 y 9,8 veces superior a la 7.

Análisis de cobre en los tejidos

Las medidas de cobre en los tejidos de las muestras de *Ptychostomum capillare* de cada parcela nos muestran un aumento no paralelo al nivel de cobre en el suelo (Fig. 9). Como referencia, el contenido de cobre de los tejidos del musgo cuprófilo *Scopelophila cataractae* fue de 6565,718 µg Cu/g, casi 7 veces más que el máximo obtenido para las muestras de *P. capillare* (parcela 9, Fig. 9).

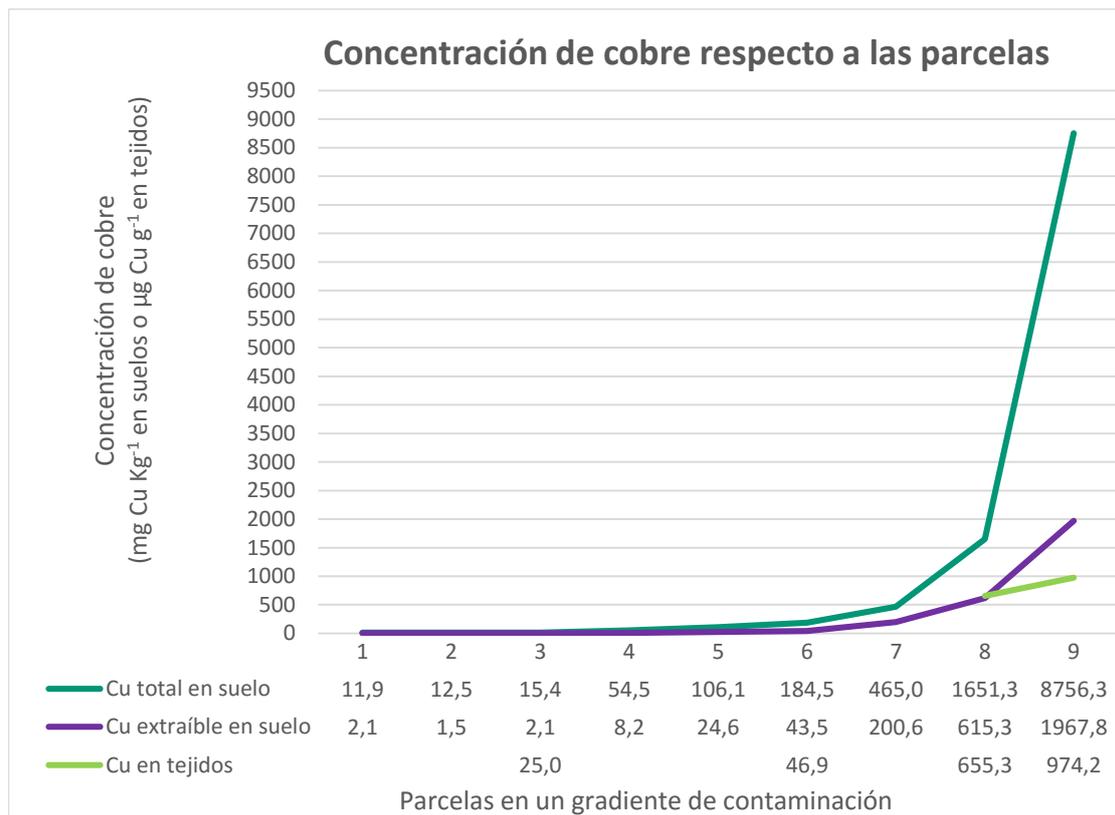


Fig. 9: Gráfica de concentración de cobre en suelos y en tejidos respecto al gradiente formado por las parcelas

Análisis de características poblacionales

Se observaron diferencias significativas en los tamaños poblacionales de las 9 parcelas (anova $p < 0,001$). Sin embargo, las diferencias no parecen estar relacionadas con el contenido en cobre (Fig. 10). Destacan una de las parcelas sin perturbación (parcela 6) que parecen tener céspedes con tamaños algo mayores.

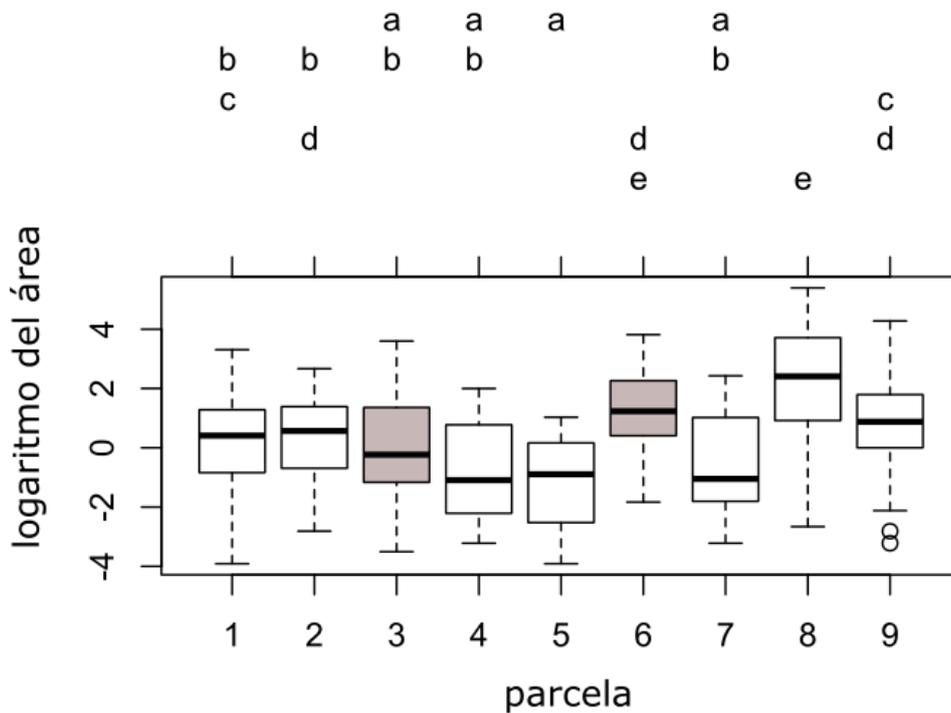


Fig. 10: *Box-plot* del logaritmo del área en cada parcela. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p-valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

La variable de reproducción sexual no se tuvo en cuenta para los análisis estadísticos ya que no se encontraron esporofitos (nuevos o de años anteriores), ni anteridios o arquegonios en ninguna de las parcelas.

El análisis LDA muestra una agrupación de las medidas de las dimensiones de las almohadillas en función de la parcela de origen, y una distribución de estas a lo largo de dos ejes (Fig. 11). El eje 1 está correlacionado positivamente con el nivel de cobre en el sustrato (Fig. 12 y

Tabla 8: Correlación de Pearson de las variables de cobre, pH, % de materia orgánica y humedad con los ejes del análisis discriminante LDA. Estadístico (p.valor)

	Eje 1	Eje 2
Cu	0,55 ($2,16 \cdot 10^{-05}$)	-0,29 (0,04)
pH	0,48 ($2,65 \cdot 10^{-04}$)	-0,46 ($6,06 \cdot 10^{-04}$)
% mat. org.	-0,67 ($4,39 \cdot 10^{-08}$)	-0,32 (0,02)
Humedad	-0,77 ($1,97 \cdot 10^{-11}$)	-0,33 (0,02)

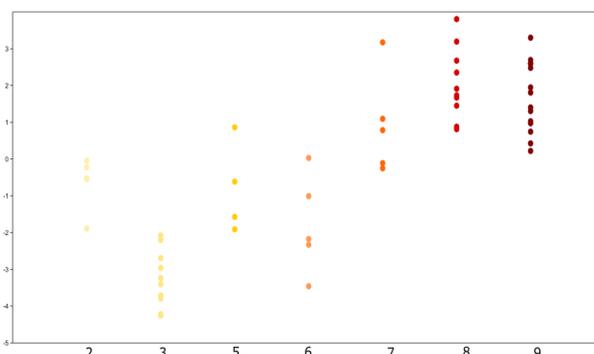


Fig. 12: Grafica que muestra la relación positiva de eje 1 del LDA con el contenido de cobre de la parcela.

Tabla 8) y negativamente con las variables de materia orgánica y humedad (que están altamente correlacionadas entre sí, 0,919 – p.valor de $2,62 \cdot 10^{-22}$). El eje 2 se correlaciona con variables ambientales como el pH (Tabla 8). Este modelo clasifica correctamente el 81,13% de los casos (43,4% si aplicamos Jackknifed).

En la gráfica continuación (Fig. 11) aparecen las 4 variables que se relacionan mejor con los dos primeros ejes, y que por lo tanto nos permitirán discriminar mejor entre parcelas. Estas variables son: densidad, tamaño de las yemas rizoidales, porcentaje de amarilleamiento y porcentaje de otros organismos.

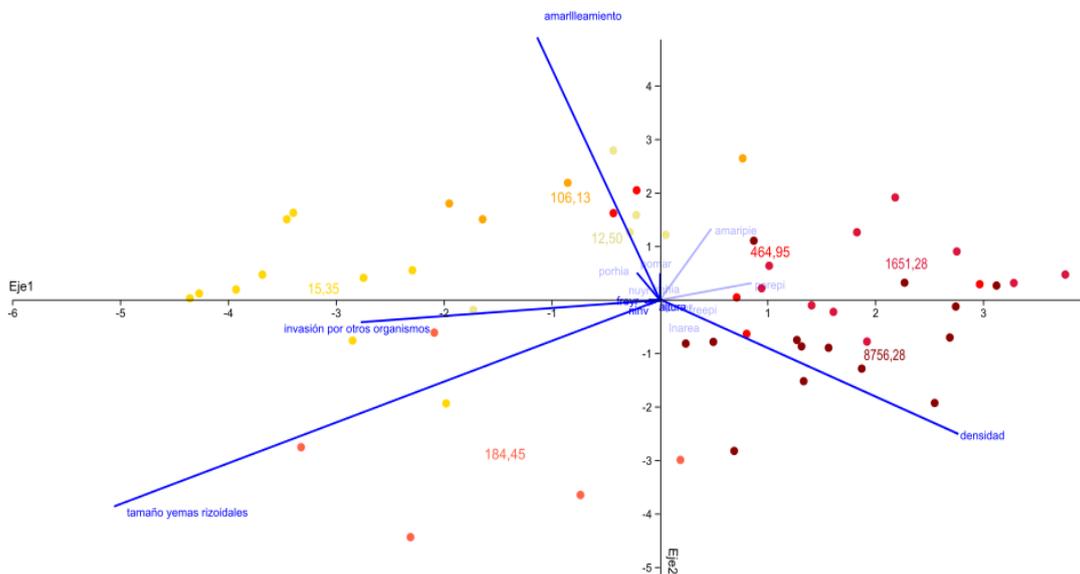


Fig. 11: Gráfica LDA en la que cada punto representa una población medida, y cada color, una de las 9 parcelas.

La densidad de los céspedes (n° brotes/cm²) está igualmente relacionada con ambos ejes, por lo que será una combinación de cobre y factores ambientales (materia orgánica y humedad) la que explique su variabilidad (eje 1: 7,5028 y eje 2: -5,2585). Al comparar con el gradiente de cobre aparecen dos grupos, uno formado por las parcelas más afectadas (parcelas 8 y 9) que tienen, en general, valores mayores de densidad y el otro por las menos afectadas por el cobre (parcelas 1, 2 y 3) con dos parcelas de transición entre ambos grupos (Fig. 12). En cualquier caso la variabilidad intra-parcela es muy alta y, por ejemplo, aunque la parcela más afectada por cobre (parcela 9) muestra una media de densidad de ejes notablemente mayor que las parcelas poco afectadas (parcelas 1, 2 y 3) no presenta diferencias significativas con estas debido al alto rango de variación.

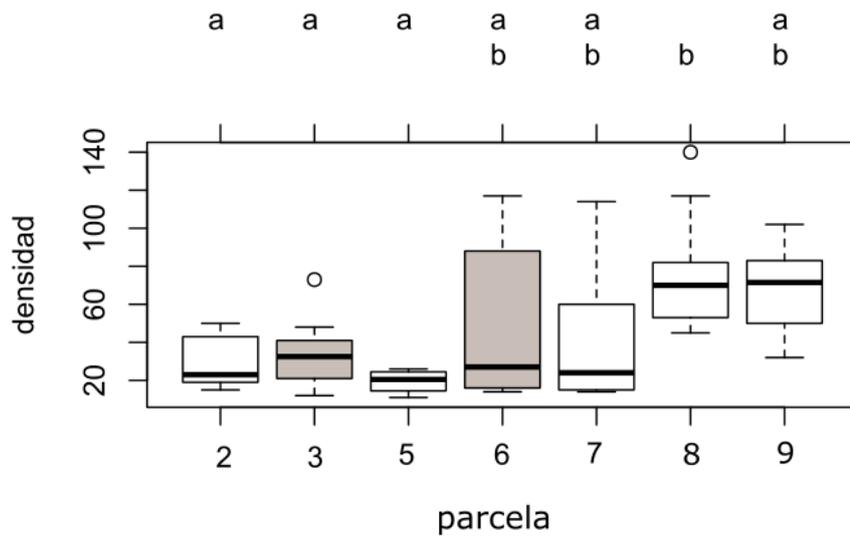


Fig. 12: *Box-plot* de la densidad respecto al nivel de cobre. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p -valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

El tamaño de las yemas rizoidales es uno de las variables con mayor peso en los ejes 1 y 2 del el LDA (Eje 1: -14,177, Eje 2: -11,27). Al analizar las diferencias entre parcelas de las yemas rizoidales se observa que existen diferencias significativas intra-grupos (p -valor = 0,026). Sin embargo, al compararlo con el gradiente de cobre no aparecen grupos claros (Fig. 13) principalmente debido a la gran variabilidad del parámetro.

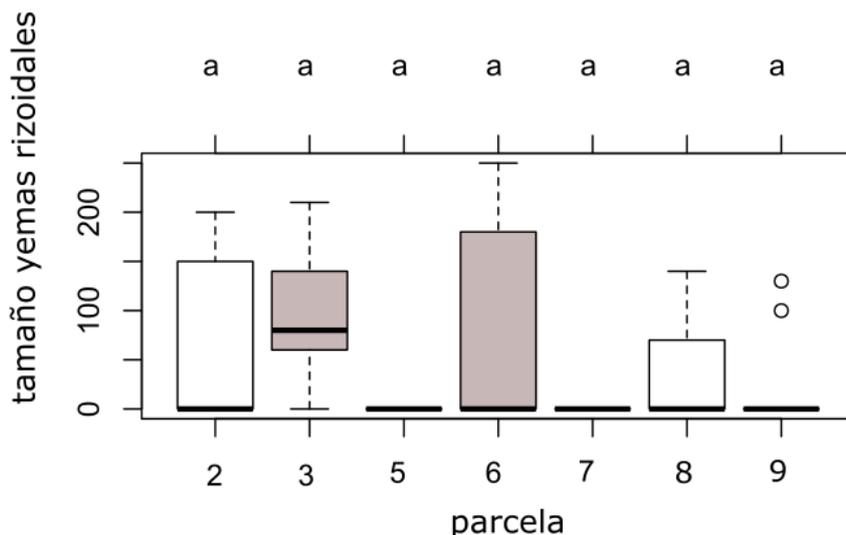


Fig. 13: *Box-plot* del tamaño de las yemas rizoidales respecto al nivel de cobre. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p -valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

El amarilleamiento está más ligado al eje 2 (13,101, frente al -3,0287 del eje 1). El análisis de la varianza detecta diferencias significativas entre las parcelas (p -valor $< 0,000$). Sin embargo, no se observa ningún patrón claro relacionado con el cobre y la mayor diferencia se encuentra entre la parcela 6 (sin perturbación pero con cobre) y las demás (Fig. 14).

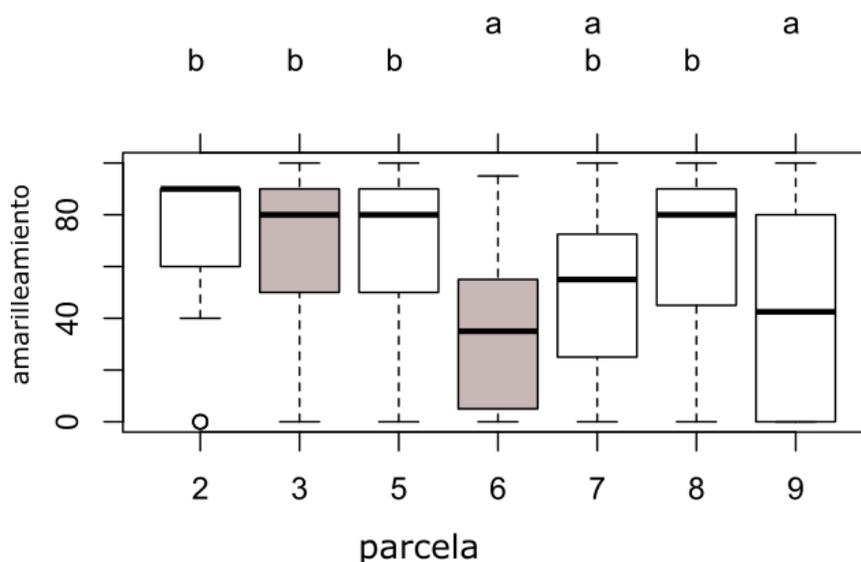


Fig. 14: *Box-plot* del porcentaje de amarilleamiento en los ápices respecto al nivel de cobre en el suelo. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p -valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

El porcentaje de otros organismos (líquenes y plantas vasculares) está más relacionado con el cobre que con otros factores ambientales (-7,566 en el eje 1 y -1,9205 en el eje 2) en el análisis de LDA. En análisis de la varianza detecta diferencias significativas entre parcelas (p -valor $< 0,0001$). Las comparaciones post-hoc muestran una tendencia a la disminución de otros organismos en las parcelas con más cobre, de modo que las parcelas 7, 8 y 9 (Fig. 15) forman un grupo diferenciado significativamente distinto a las parcelas con menor efecto del cobre (1, 2 y 3). Destacan los altos porcentajes de otros organismos en la parcela 3 que está poco afectado por el cobre y tiene además poca perturbación (Fig. 15).

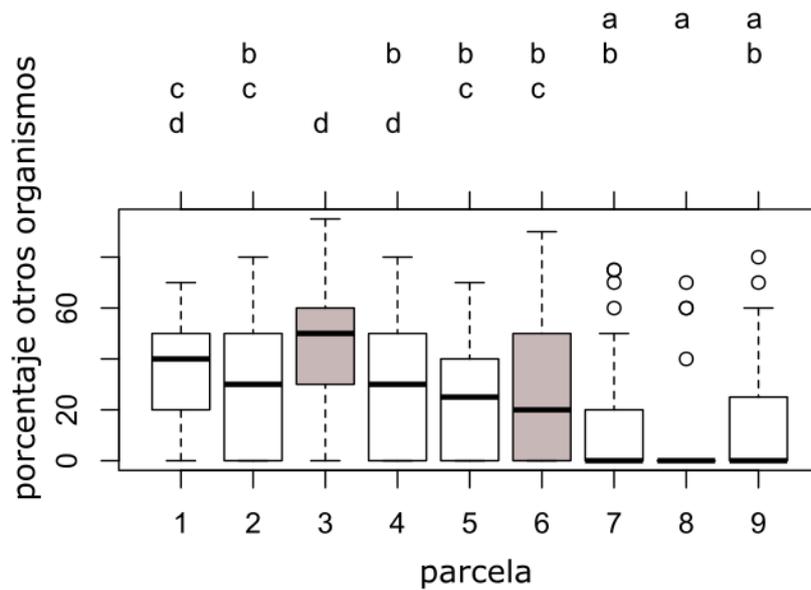


Fig. 15: *Box-plot* del porcentaje de otros organismos respecto al nivel de cobre. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p-valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

En general, las variables que son importantes en el análisis LDA no tienen efectos individuales muy marcados. Sin embargo, estas variables en combinación explican razonablemente bien las diferencias entre parcelas y están correlacionadas con el cobre, esto indica que los céspedes de parcelas con mayor afección por cobre presentan algún tipo de afectación, bien sea en la densidad de los céspedes, el tamaño de las yemas rizoidales, el amarilleamiento o el porcentaje de otros organismos.

Además de las variables que aparecen en la LDA, en el análisis univariante se observan otras variables que presentan diferencias significativas entre parcelas. La variable que mide la frecuencia de aparición de daño celular presente como células hialinas tiene diferencias significativas entre las parcelas (p-valor = 0,001). Al realizar las comparaciones múltiples no parece haber grupos bien diferenciados relacionados con la cantidad de cobre (Fig. 16). Sin embargo al ordenar las parcelas respecto al gradiente de humedad sí se forman dos grupos en los que las parcelas menos dañadas se concentran en la zona con mayor humedad (Fig. 16).

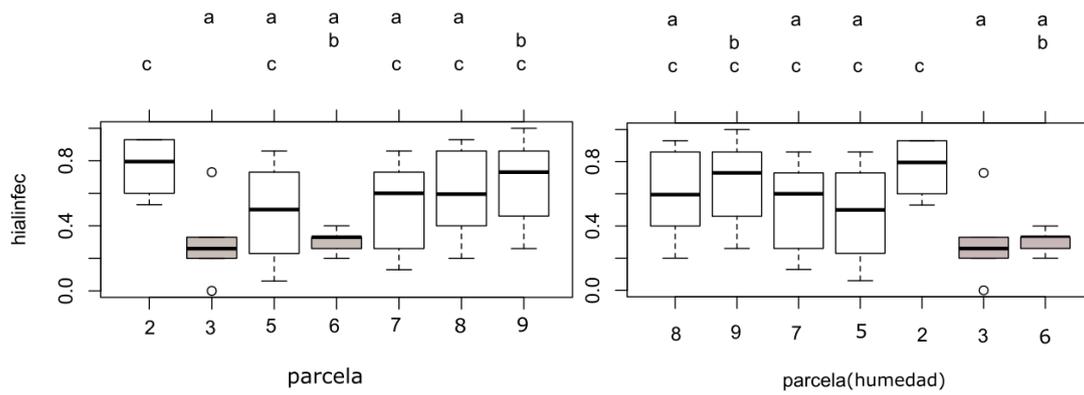


Fig. 16: *Box-plots* de la frecuencia de células hialinas respecto al nivel de cobre (izquierda) y respecto al nivel de humedad (derecha). Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p-valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

La frecuencia de aparición de epífitos también presenta diferencias significativas intra-grupos (p-valor = 0,038). Sin embargo, al realizar las comparaciones entre parcelas no encontramos grupos relacionados con la cantidad de cobre. Sí aparece una tendencia a que los valores medios aumenten cuando la cantidad de cobre es intermedia (parcela 5; Fig. 17) y a disminuir cuando el cobre tiene valores muy elevados (parcelas 7, 8 y 9; Fig.17). Sin embargo, esta tendencia queda enmascarada por un lado por la alta variabilidad de la variable y por otro porque la parcela de control de perturbación (parcela 6; Fig. 17) muestra valores que no concuerdan con esta tendencia. Al igual que ocurría con el daño celular, al pasar de frecuencia a porcentaje de epífitos por filidio, no aparecen diferencias entre parcelas (p-valor = 0,205).

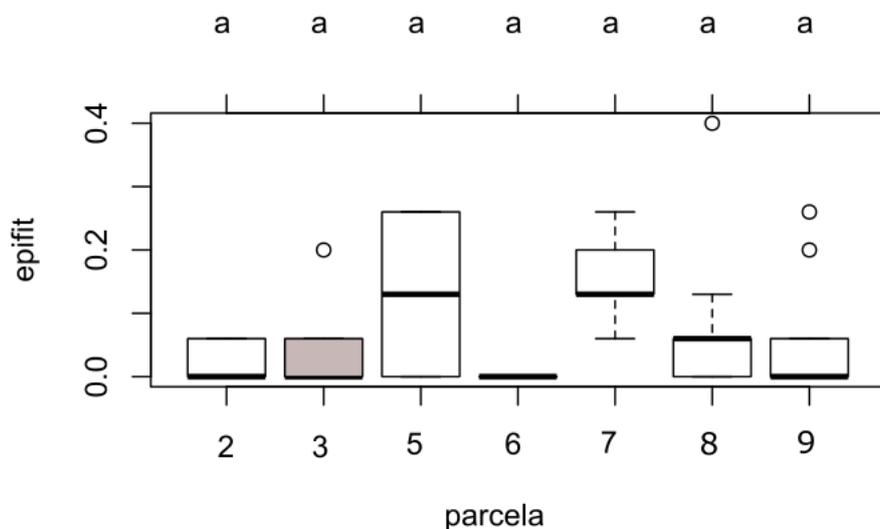


Fig. 17: *Box-plot* de la frecuencia de epífitos respecto al nivel de cobre. Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p-valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

La altura máxima de los brotes por césped, es un parámetro muy variable que en el análisis de la varianza posee diferencias entre parcelas (p -valor $< 0,0001$). Además, al comparar las parcelas entre sí, se observa que las parcelas con mayor contenido en cobre (parcelas 7, 8 y 9) muestran una menor altura en comparación con el resto (Fig. 18). Aunque, de nuevo, la variabilidad intra-parcela es muy alta y las diferencias no son del todo claras (las parcelas 2 y 9 no muestran diferencias significativas entre sí). Al ordenar las parcelas respecto al gradiente de humedad parece que hay varios grupos pero las diferencias no son claras por la elevada variabilidad intra-parcela (Fig. 18).

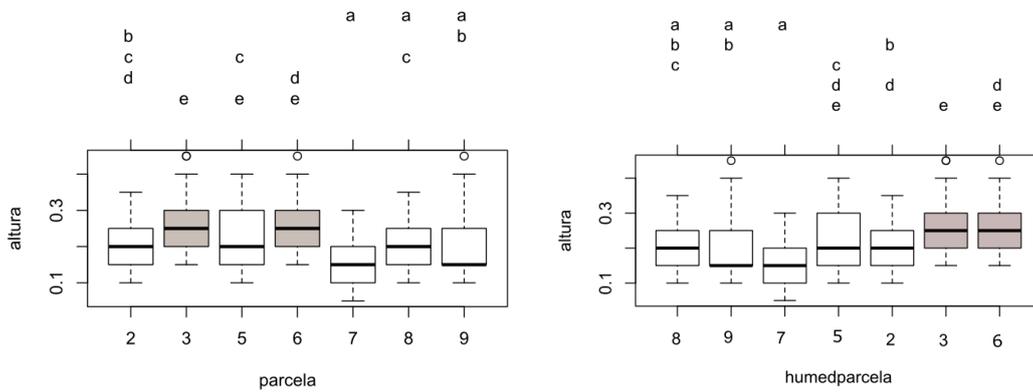


Fig. 18: *Box-plots* de la altura máxima respecto al nivel de cobre (izquierda) y respecto al nivel de humedad (derecha). Las parcelas designadas letras diferentes muestran diferencias significativas entre sí (p -valor = 0.05). Las cajas de color gris indican las parcelas con baja perturbación.

Observaciones/Caracteres cualitativos

Además de las variables medidas se encontraron caracteres que parecen estar relacionadas con el nivel de cobre de las parcelas. En las parcelas 8 y 9 se encontró protonema de *Ptychostomum capillare*, es decir, filamentos correspondientes al estado juvenil, indiferenciado, de la fase gametofítica, foliosa, dominante en el musgo. Este protonema era más abundante en las poblaciones en peor estado (Fig. 19, arriba). En estas mismas parcelas aparecen abundantes ejes en los que el caulidio estaba muy elongado, mientras que los filidios no se habían desarrollado totalmente.

A escala macroscópica, la ocupación por algas epífitas de las poblaciones de *P. capillare* es mayor en las parcelas 7 y 8, donde llegan a cubrir totalmente las almohadillas (Fig. 19, abajo).

Sin embargo, en la parcela 9 desaparece la capa de algas. Las algas que componen la comunidad de epífitos son muy variadas. Por ejemplo, en la parcela 8 se ha observado

Microspora sp. (Div. Chlorophyta), algas cocoides tipo *Trebouxia* (Div. Chlorophyta), y

cianobacterias como *Leptolyngbya*, *Nostoc* spp. y otras del O. Chroococcales (Bellinger & Sigeo, 2010).

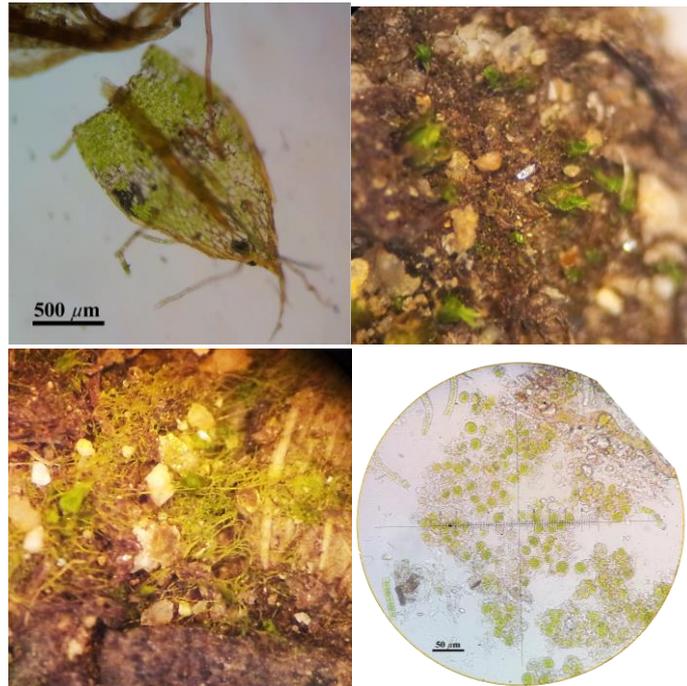


Fig. 19: Protonema surgiendo a partir de un filidio (arriba, izquierda), protonema marrón en una población de la parcela 9 (arriba, derecha), comunidad epífita sobre una población de la parcela 8 a la lupa (abajo, izquierda) y bajo el microscopio (abajo, derecha).

Análisis histoquímicos y MEB-EDAX

El tratamiento con ácido rubeánico resultó en unos precipitados de color oscuro, extracelulares, en la muestra de la parcela 9 (Fig. 20, abajo). Además aparecen paredes más oscuras en algunos nervios (Fig. 20, abajo). En los filidios viejos, en general, la tinción es muy irregular. En el musgo cuprófilo *S. cataractae*, usado como referencia, y del que se sabe que es capaz de acumular cobre en su pared, se tiñen las paredes del nervio y la zona hialina del filidio (Fig. 20 arriba). En la muestra de la parcela 3 (control fuera del área de la mina, sin perturbación y sin cobre) no aparecen ni precipitados extracelulares ni se tiñe la pared.

El tratamiento con rojo de rutenio teñía las paredes celulares, pero no se observaba la tinción extracelular propia del mucílago. Parece que tiene escasa especificidad, y detecta, además, la pectina de las paredes. El tratamiento con azul Alcian produce una coloración dispersa en planos extracelulares, pero no se observa presencia de mucílago en las zonas esperadas como en el ápice. La tinción con Sudan Black

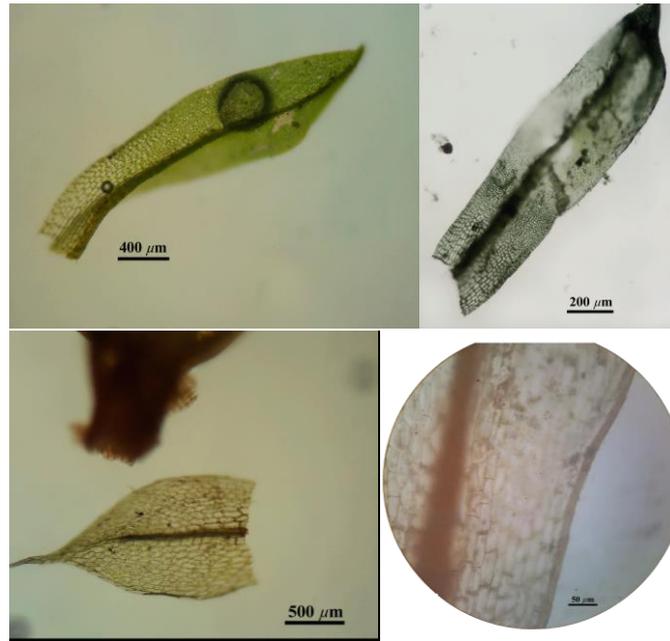


Fig. 20: Filidios de *Scopelophila cataractae* sin tratar (arriba, izquierda) y tratado (arriba, derecha) con ác. rubeánico. El cobre se deposita en gránulos extracelulares (abajo, izquierda) o en las paredes del nervio y el margen del filidio (abajo, derecha) en las muestras de la parcela 9.

B dio una coloración negruzca en planos extracelulares de algunos filidios, lo que demuestra la presencia de sustancias lipofílicas, probablemente ceras, en *Psychostomum capillare*.

En las muestras lavadas con cloroformo, no se observó tinción con Sudan Black B. Aunque quedaron restos teñidos con azul Alcian (presumiblemente mucílagos), al repetir la prueba específica para el cobre con ácido rubeánico, no se observó presencia de cobre en depósitos extracelulares (a diferencia de filidios no tratados con cloroformo). Estas pruebas parecen indicar un papel de las ceras como mecanismo de barrera ante el cobre.

En los análisis de MEB-EDAX, como se especificaba en la sección de Material y Métodos, se observaron separadamente muestras de la base de los brotes de musgos (con abundancia de tejidos muertos) y muestras del ápice (constituidas principalmente por tejido vivo). En ambos casos se observaron ejemplares lavados con cloroformo y sin lavar (Tabla 9).

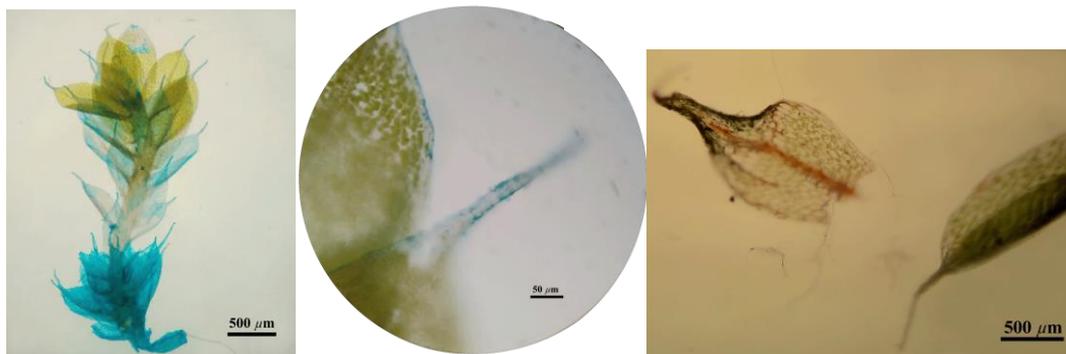


Fig. 21: Respuesta a las tinciones de azul de Alcian (izquierda y centro) y Sudan Black B (derecha)

Tabla 9: Porcentaje de Cu medido con la sonda EDAX en cada tipo de preparación.

Muestra	Lavado	Parte	% de peso atómico	DS
Parcela 3 - control	No/Sí	Apical	0	0
Parcela 3 - control	No/Sí	Basal	0	0
<i>S.cataractae</i>	No	Apical	0,257	0,125
<i>S.cataractae</i>	No	Basal	0,381	0,348
<i>S.cataractae</i>	Sí	Apical	0,259	0,124
<i>S.cataractae</i>	Sí	Basal	0,263	0,076
Parcela 9 – máx. Cu	No	Apical	0,053	0,069
Parcela 9 – máx. Cu	No	Basal	0,256	0,321
Parcela 9 – máx. Cu	Sí	Apical	0,035	0,072
Parcela 9 – máx. Cu	Sí	Basal	0,099	0,084

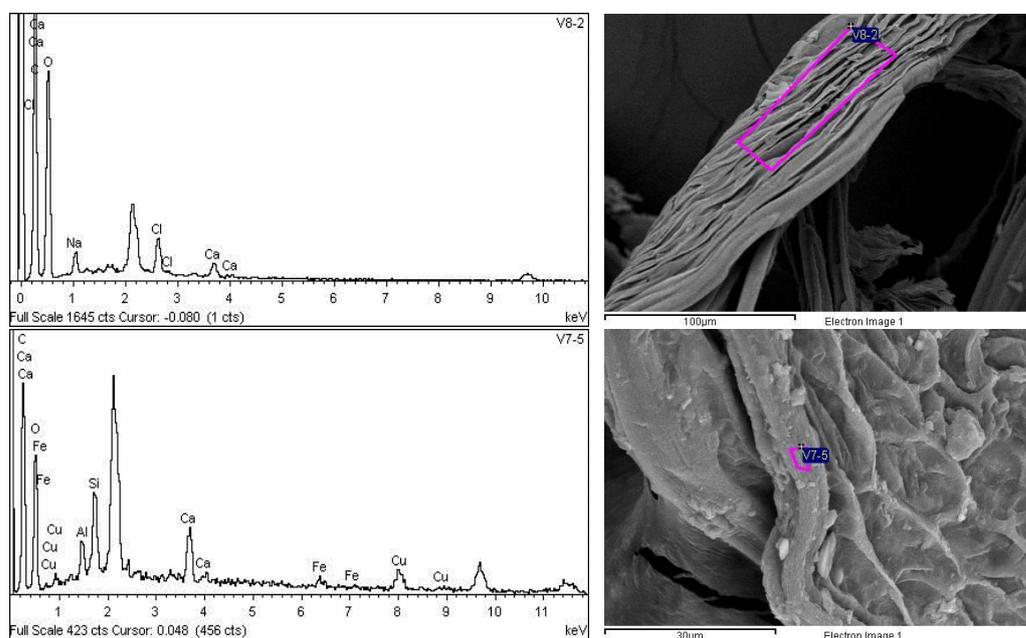


Fig. 22: Espectros EDAX de la composición elemental e imagen de MEB de un filidio basal lavado (arriba) y uno sin lavar (abajo) de la parcela 9. En el no lavado aparece en mayor proporción Cu, Si Ca y Fe.

Con respecto al musgo cuprófilo *S. cataractae*, usado como referencia, las partes basales tenían más cobre que las apicales en las muestras no tratadas con cloroformo. En la preparación lavada de *S. cataractae* había niveles similares de cobre en ambos estados del desarrollo, aunque en las partes basales se obtenían valores más estables (Tabla 9).

En las muestras de *Ptychostomum capillare* de la parcela 3 (control, fuera del área de la mina) no se detectó cobre en ninguna de las preparaciones (Tabla 9). Sin embargo, este metal se detectó en niveles variables en las muestras de *P. capillare* de la parcela 9 (Tabla 9, Fig. 22). En las muestras sin lavar encontramos cobre en niveles variables tanto en ápices como en regiones basales, aunque aparece más abundantemente sobre todo en los filidios viejos. En las muestras lavadas se reduce el porcentaje de peso atómico detectado de cobre en más de la mitad, aunque también aparece cobre en los filidios viejos.

En general en las muestras de *P. capillare* hay una mayor variabilidad que en las de *Scopelophila cataractae* (Tabla 9). Parece que las concentraciones más altas en *S. cataractae* aparecen en el nervio y la base del filidio, mientras que en *P. capillare* se observa mayor abundancia en el caulidio y el margen del filidio en regiones basales. Además se comprueba con este tipo de microscopía que existe una sustancia, posiblemente ceras, que oscurece los contornos celulares y que desaparece con el lavado con cloroformo (Fig. 23). Estos resultados, asimismo, parecen corroborar lo obtenido en las pruebas histoquímicas.



Fig. 23: Imágenes del MEB, de filidios de *P. capillare* recogido en la parcela 9. Existe una diferencia de definición del contorno celular, esta es menor en la muestra sin lavar (izquierda) que en la muestra lavada (derecha)

Discusión

Estado del suelo y contenido de cobre en los tejidos

Los niveles de cobre en el suelo de la parcela con mayor contenido en cobre (parcela 9) de la mina La Estrella son superiores a los considerados máximos para suelos industriales (8000 mg Kg^{-1} , BOCM, 2006). Sin embargo, en las parcelas consideradas lejos de la influencia de la mina los suelos tienen un contenido en cobre por debajo del VR90 (valor de referencia que indica el punto en el que los suelos comienzan a manifestar “anormalidades” por la presencia de contaminantes), que para el cobre está en 20 mg Kg^{-1} (BOCM, 2006). Las parcelas con valores considerados como normales en suelos naturales están situadas, la más cercana, a apenas 25 metros del foco principal de contaminación. La diferencia entre las parcelas 4 y 5 (de hasta el doble de contenido de cobre, estando a la misma distancia del foco) podrían deberse a que la parcela 5 se encontraba en la zona de escorrentía de la mina, mientras que la parcela 1, que tiene el menor contenido en cobre, está aproximadamente a la misma distancia que las parcelas 4 y 5, pero pendiente arriba. Estos resultados concuerdan con la importancia dada al relieve y la dinámica del agua en la difusión de la contaminación generada en minas (Clark *et al.*, 2010).

Al comparar los resultados de la fracción de cobre asimilable presente en el suelo con el contenido de cobre en tejidos, vemos que en la parcela 9, con máximas cantidades en ambas variables, el aumento del contenido de cobre en los tejidos en relación al hallado en la parcela 8 (la siguiente en magnitud) es mucho menor que lo esperado según la diferencia que ambas presentan en cuanto al cobre asimilable en su suelo. Esto no concuerda con lo encontrado por Vukojević *et al.* (2005), que hallaron concentraciones de hasta $5250 \mu\text{g g}^{-1}$ en *Ptychostomum capillare* en suelos con contenido en cobre casi cinco veces más bajo que el de nuestro estudio. Esto puede deberse a diferencias en las condiciones del suelo entre los dos estudios, aunque es preciso resaltar que Vukojević *et al.* (2005) no aportan el contenido de cobre asimilable en los suelos que estudian, por lo que es posible que la cantidad de cobre asimilable sea mayor que en nuestro trabajo, aunque no sea posible deslindarlo en sus condiciones de análisis (sobre cenizas). En

cualquier caso, los autores clasificaron *P. capillare* como una especie hiperacumuladora. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que, aun siendo ciertos los datos de estos autores, la especie no se comporta como tal en todos los casos, sino que su capacidad de acumulación puede variar enormemente.

La comparación de los niveles en el tejido de *P. capillare* con los presentes en *S. cataractae*; la especie que empleamos como referencia, de conocidos requerimientos cuprófilos y capacidad de acumulación de metales en sus paredes celulares, encontramos que la cantidad de cobre absorbido en el tejido en *S. cataractae* ($6500 \mu\text{g g}^{-1}$) está muy por encima del máximo encontrado en *P. capillare* ($974 \mu\text{g g}^{-1}$). Por lo tanto, podemos suponer que, al contrario que *S. cataractae*, la especie aquí estudiada no requiere altos niveles de cobre para vivir. Muy al contrario, cuando el contenido de cobre en suelo es muy elevado, *P. capillare* parece ser capaz de mantenerlo fuera de forma activa, como demuestran tanto las comparaciones entre cobre absorbido y cobre asimilable presente en el suelo, como los análisis histoquímicos y por MEB-EDX.

Sin embargo, llama la atención el resultado de la parcela 3, ya que encontramos $25 \mu\text{g}$ de Cu por gramo de material seco en el tejido a pesar de que en el suelo la cantidad de cobre es menor. Esto podría indicar que el nivel necesario para el desarrollo en *P. capillare* estaría en torno a los $25 \mu\text{g g}^{-1}$ al menos en las condiciones de este estudio. Esta concentración se encuentra cerca del límite de toxicidad de $20\text{-}30 \mu\text{g g}^{-1}$ dado por Hernández-Colorado *et al.* (2012), por lo que parece que en torno a esas cantidades la especie responde con una absorción y acumulación activa del metal, lo que concuerda parcialmente con lo encontrado por Vukojević *et al.* (2005). Además, esto podría ser una de las razones que explican su resistencia al cobre, ya que necesitaría de forma natural niveles más altos que la mayoría de las especies.

Efectos del cobre en los epífitos de los musgos

Se ha observado un aumento considerable de la frecuencia de epífitos cuando aumenta el cobre en el suelo desde valores normales hasta 100 mg Kg^{-1} . En esta situación, el efecto negativo del cobre en *Ptychostomum capillare* podría impedir que pueda desarrollar mecanismos para deshacerse de la carga de epífitos innecesaria. Un fenómeno análogo se ha descrito en ambientes boreales, donde, en condiciones naturales, las poblaciones saludables de musgos serían capaces de eliminar sus epífitos, a menos que fueran necesarios para restablecer sus niveles de nitrógeno (De Luca *et al.*, 2007).

A estas concentraciones de cobre en el suelo, aumenta sobre todo la presencia del clorófito filamentosos *Microspora* sp., que constituye la mayor parte de la biomasa de epífitos. Algunas especies de este género son tolerantes a altas concentraciones de cobre, por lo que no es raro encontrarlas en nuestro estudio (Francke & Hillebrand, 1980). Sin embargo, a concentraciones de cobre en el suelo 16 veces superiores, la cobertura de epífitos desciende, posiblemente por factores limitantes relacionados con la resistencia de las algas a altos niveles de cobre durante períodos prolongados (Francke & Hillebrand, 1980). También es posible que la comunidad varíe según el nivel de cobre (Thomas & Seibert, 1977) y que la capacidad de *P. capillare* para controlar las especies de esta sucesión sea diferente en cada caso.

La reducción observada en la cobertura de la parcela por parte de otros organismos terrícolas al aumentar el nivel de cobre sugiere que los briófitos tienen una mayor resistencia a este contaminante, superior, por ejemplo, a la de los líquenes terrícolas. Esto corrobora algunos estudios que afirman su mayor sensibilidad a las perturbaciones del medio (Bačkor & Loppi, 2009; Bosch-Roig *et al.*, 2013).

Efecto del cobre en las variables características del estado y desarrollo poblacional

En general no se observó un efecto directo y unívoco claro en ninguna de las variables medidas. Sin embargo, varias de ellas mostraron una cierta respuesta al aumento del cobre perceptibles sobre todo en la escala de césped. Parece claro que en las parcelas con mayor contenido en cobre la mayoría de los céspedes mostraron uno u otro efecto (cambios en el porcentaje de amarilleamiento, en el tamaño de las yemas rizoidales o aumento de la densidad del césped). Sin embargo, la alta variabilidad en las variables características del estado de la población y el efecto de otros parámetros del suelo dificulta individualizar el efecto del cobre presente en el suelo.

Una de las respuestas más claras es el efecto positivo de la cantidad de cobre en la densidad de brotes. Este efecto puede deberse a la disminución de la competencia interespecífica, ya que en las parcelas menos afectadas crecían otras especies que parecían desplazar a *Ptychostomum capillare*. Este comportamiento se debe en parte a la menor capacidad de competencia de *P. capillare* en suelos con niveles normales de cobre, donde aparece compartiendo su hábitat (o incluso invadida) con especies como *Tortella squarrosa*, *Syntrichia ruralis* u *Homalothecium* sp. (véase Tabla 10). Se ha documentado

un efecto similar en *Scopelophila cataractae*, que, al disminuir los niveles de cobre en su medio, se ve desplazada por otras especies más competitivas (Nomura & Hasezawa, 2011).

El tamaño de las yemas rizoidales se ve afectado por el cobre, lo cual concuerda con lo esperado para otros musgos (Glime, 2007a). Sin embargo, que este efecto se deba exclusivamente al cobre

no está claro. En cuanto a la reproducción sexual, carecemos de información para evaluar si se ve afectada por el cobre ya que ni siquiera el control desarrolló estructuras de reproducción sexual. Es posible que las condiciones climáticas, a la proximidad de la carretera, o la perturbación general de la zona, sean adversas para la reproducción sexual de este musgo.

A pesar de no tener un efecto claro sobre los daños celulares, como se ve en las variables de amarilleamiento y frecuencia de células hialinas (Fig. 14 y 16), el cobre puede estar afectando a los céspedes. En el caso del amarilleamiento se ve una gran variabilidad en las parcelas más afectadas (parcela 8 y 9), por lo que en ellas el cobre podría estar dañando solo a algunos céspedes disminuyendo su producción de clorofila o degradando las membranas celulares lo que produciría la muerte celular en ambos casos (Brown & Wells, 1990; Guschina & Harwood, 2002; Panda & Choudhury, 2005; Shakya *et al.*, 2008).

Efectos de otros factores ambientales

Los restantes factores ambientales, además de su efecto directo sobre el organismo, también pueden influir en la capacidad del contaminante de afectar a las comunidades. La biodisponibilidad de los metales pesados depende de parámetros del suelo, de la planta y del ambiente en el que estos estén (Adriano *et al.*, 1997; Wong, 2003).

En general las parcelas 6 y 3 (parcelas sin perturbación con y sin cobre respectivamente), a pesar de sus diversos contenidos en cobre en el suelo, tienen un valor mayor en las variables que podríamos considerar positivas en cuanto al estado del musgo, como la altura, el tamaño de las yemas rizoidales, etc., y valores bajos en las variables de daño celular y tisular. Esto nos indica la importancia del buen estado del suelo en la paliación de los efectos del cobre. En especial, se ha señalado la importancia de la humedad, la materia orgánica y la estructura en la disponibilidad de los metales pesados (Wong, 2003).

Tabla 10: Especies que más comúnmente aparecían junto a *Ptychostomum capillare*

<i>Bryum dichotomum</i>
<i>Didymodon</i> sp.
<i>Homalothecium</i> Cf. <i>sericeum</i>
<i>Syntrichia ruralis</i>
<i>Tortella squarrosa</i>

Es especialmente notable el efecto que tiene el balance hídrico en la frecuencia de la aparición de células hialinas. En estudios con *Tortula muralis* Hedw. se vio que la desecación y posterior rehidratación causaba daños en el cloroplasto y en la membrana celular (Schonbeck & Bewley, 1981). Esto explica que las parcelas donde menos se conserva la humedad, y presumiblemente más sometidas a fluctuaciones del contenido hídrico, sean las que más daño tienen en sus tejidos fotosintéticos.

Parece claro que no es solo el cobre lo que está afectando a las poblaciones, sino que las variables del suelo también influyen en su desarrollo y estado de salud. Asimismo, se sugiere también que los efectos tanto del cobre como de otras variables afectan en mayor medida a la frecuencia de los daños y no tanto al área afectada por tales daños. Es decir, a pesar de aumentar la incidencia del estrés por el cobre y la perturbación del suelo, los individuos siguen resistiendo con un nivel de daño similar, aunque aumenta el número de individuos con signos de daño.

Caracteres cualitativos: presencia de protonema persistente

En la parcela 9, la de niveles de cobre propios de suelos industriales, la presencia de protonema, presumiblemente procedente de la desdiferenciación de células vegetativas del filidio, es llamativa, ya que *Ptychostomum capillare* no es una de las escasas especies de musgos en los que persiste esta fase juvenil tras el desarrollo del gametofito adulto (Guerra *et al.*, 2010). Es plausible considerar esta persistencia del protonema como una forma de resistencia a la contaminación por cobre. Podría constituir una estrategia para la colonización rápida del terreno y la propagación asexual (Fig. 24). Este mecanismo se ha documentado en otros briófitos ante condiciones adversas para el crecimiento vegetativo (Whitehouse, 1980; Nomura & Hasezawa, 2011).

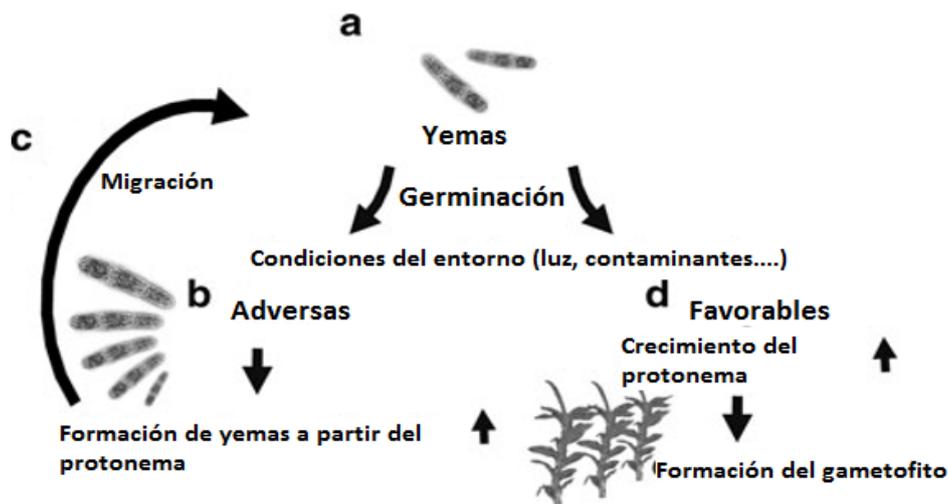


Fig. 24: Modelo hipotético de la estrategia de expansión dependiendo de las condiciones ambientales. a: llegada de las yemas a un nuevo ambiente. b: en condiciones adversas se promueve la formación de yemas a partir del protonema. c: las yemas se siguen formando y migran hasta encontrar un ambiente propicio. d: una vez en ambientes favorables no se promueve la formación de yemas sino que el protonema crece y desarrolla el gametofito. Modificado de Nomura & Hasezawa, 2011.

Mecanismos de resistencia en *Ptychostomum capillare* y uso como bioindicador

La falta de correspondencia entre las diferencias en niveles de cobre asimilable en el suelo entre las parcelas y las que aparecen en el encontrado en los tejidos de sus poblaciones de *Ptychostomum capillare*, como se detecta en los análisis por absorbanza atómica, apuntan a un posible mecanismo de exclusión por parte del musgo que explicaría en parte su resistencia a este metal. Esta estrategia podría consistir en la producción de barreras frente al contaminante.

Los briófitos pueden secretar diferentes tipos de sustancias. La más conocida común es el mucílago (Berthier, 1970), que usan como protección contra la desecación de las zonas más delicadas (Berthier *et al.*, 1974) y para eliminar los epífitos (DeLuca *et al.*, 2007). No hay razón para no esperar que el mismo mecanismo que les protege de los epífitos esté sirviendo para permitir su crecimiento en terrenos contaminados o en áreas donde llega la deposición atmosférica de metales pesados. Sin embargo, hemos encontrado en *P. capillare* escasa producción de mucílago en las localizaciones clásicas en musgos, como las axilas de los filidios o el meristemo apical (Berthier, 1970). Sin embargo en los rizoides y en los ápices de los filidios sí se detecta. Habría que estudiar con mayor detalle su posible papel en la protección frente al cobre, que en este trabajo no se ha manifestado.

Sin embargo, los resultados con las pruebas histoquímicas y con los análisis MEB-EDX parecen corroborar la estrategia de exclusión basada en sustancias extracelulares y solubles en cloroformo, probablemente ceras, que eviten la entrada del cobre a los tejidos. En general, se considera que las ceras aparecen en los musgos endohidros que tienen mayor desarrollo de sistemas conductores (Buch, 1945; Proctor, 1979) pero no en las especies ectohidras (sin células conductoras). En esta especie el desarrollo de tejidos conductores es pobre. Sin embargo, ha de considerarse el escaso conocimiento que se tiene de las sustancias secretadas por los briófitos, y del papel jugado por éstas, que ha de estudiarse en un amplio espectro taxonómico en el grupo.

Esta especie, *P. capillare*, presenta además otro posible mecanismo para evitar la entrada del cobre y sus consecuentes efectos en el desarrollo de las poblaciones, consistente en un mecanismo de evitación física mediante la elongación de los caulidios, con lo que se separa la zona apical en crecimiento de la fuente de contaminación, en este caso el suelo.

Debido a estos mecanismos, es difícil establecer una relación directa entre el cobre ambiental y el que se pueda encontrar en los tejidos, tal y como sugieren para metales pesados en general Aboal *et al.* (2010) y Schröder *et al.* (2010) como advertencia ante el uso de la bioindicación directa de distintas especies de musgos, y que corroboran nuestros datos. Por lo tanto, no recomendamos el uso de *P. capillare* para estimaciones cuantitativas de los niveles de cobre en el suelo. Sin embargo, la contaminación provoca cambios en las poblaciones de esta especie que pueden ser usados para la bioindicación indirecta. Aun así hay que ser cautos en su uso, ya que, como se ha visto, el estado del suelo puede interferir en el efecto del cobre sobre los musgos (Lepp & Salmon, 1999; Aboal *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2014), como ha ocurrido en la parcela 6 (con escasas perturbaciones y buen estado del suelo, pero con contaminación por cobre).

Uso de *Ptychostomum capillare* para la remediación de suelos mineros

Un organismo adecuado para la remediación debe ser resistente, si solo se quiere hacer fitoestabilización, o hiperacumulador, en el caso de pretenderse realizar labores de fitoextracción (Wong, 2003). La capacidad de *Ptychostomum capillare* para acumular cobre parece ser muy variable y por lo tanto su utilidad en este sentido dependería de diversas condiciones (climáticas, del suelo, etc.). Sin embargo, *P. capillare* sí presenta características adecuadas como fitoestabilizador. Por un lado, es resistente a altas

concentraciones de cobre y, de hecho, es la especie que mayor cobertura presenta en las zonas con altos niveles de contaminante de la mina. Además, desarrolla rizoides de forma extensiva, por lo que contribuye a la estabilización superficial de los materiales del suelo y a la disminución de la escorrentía. A esto se suma el hecho de que es un musgo cosmopolita bastante común (Shaw & Petersen, 2005; Dierßen, 2002) que podría emplearse en prácticamente todas las partes del globo con este objetivo. Por último, parece ser poco competitivo cuando las condiciones del suelo mejoran, aunque siga habiendo cobre (como ocurre en la parcela 6 – con escasa perturbación pero con cobre). Debido a esto, tampoco sería problemática la sustitución de la especie tras la remediación, que se haría fácilmente y de manera natural mientras se va formando un suelo más estable y maduro.

Conclusiones

- La concentración de cobre en las zonas más afectadas de la mina La Estrella supera los valores genéricos de referencia de suelos en zonas industriales, pero disminuye en aproximadamente 25 metros de distancia a los valores regionales VR90 para suelos sanos.
- El nivel basal de cobre en tejidos de *Ptychostomum capillare* ($25 \mu\text{g g}^{-1}$), de rango similar a los niveles tóxicos para otras especies, podría explicar en parte la resistencia a este metal.
- Las poblaciones de *Ptychostomum capillare* se ven afectadas por las altas concentraciones de cobre en distintos parámetros del desarrollo y características celulares que pueden mostrarse en conjunto o de forma independiente.
- Se observa un efecto significativo del cobre en las variables de densidad de brotes, tamaño de las yemas rizoidales, porcentaje de amarilleamiento y porcentaje de otros organismos como líquenes y otros briófitos.
 - El cobre tiene un efecto positivo sobre la densidad de las poblaciones. Podría deberse a una disminución del efecto de la competencia con otras especies.
- La producción de protonema persistente parece estar fuertemente relacionada con el cobre y podría tratarse de una estrategia de colonización hacia zonas menos adversas.
- Otros factores ambientales, como la humedad, el pH y la cantidad de material orgánica, pueden interactuar con el efecto del cobre y producir cambios en el estado de salud y el desarrollo de las poblaciones de *Ptychostomum capillare*.
 - Esto es especialmente importante en las parcelas 3 y 6: ambas tienen más humedad y una estructura del suelo desarrollada, y además la parcela 6 contiene el doble de materia orgánica que el resto.
 - La interacción de estos factores pone de manifiesto la necesidad de un estudio del suelo detallado en trabajos de monitorización con musgos terrícolas.
- *Ptychostomum capillare* puede presentar diversos mecanismos de resistencia a la contaminación por cobre:
 - Exclusión extracelular de las partículas mediante la secreción de ceras.
 - Evitación de la fuente de cobre (el suelo) por elongación de los caulidios.

- El uso de este musgo para la bioindicación directa no está recomendado por la presencia de estas estrategias de resistencia, que distorsionan los niveles de cobre en tejidos con respecto a la concentración ambiental.
- *Ptychostomum capillare* es un buen candidato para su uso en remediación de suelos, por su resistencia a la contaminación y la perturbación, y por su baja capacidad para desplazar a otras especies en suelos en buen estado.

Bibliografía

- Aboal, J.R., J.A. Fernández, T. Boquete & A. Carballeira (2010). Is it possible to estimate atmospheric deposition of heavy metals by analysis of terrestrial mosses?. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6291-6297.
- Adriano, D.C., J. Albright, F.W. Whick, I.K. Islandar & C. Sherony (1997). Remediation of soil contaminated with metals and radionuclide-contaminated soils. In: I.K. Islandar & D.C. Adriano (Eds.), *Remediation of Soils Contaminated with Metals*. Science Reviews, Northwood, Reino Unido.
- Alloway, B.J. (1995). *Heavy metals in soils*. Springer Science & Business Media.
- Angers, D.A. & J. Caron (1998). Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. In *Plant-induced soil changes: processes and feedbacks*. Springer Netherlands. Holanda 55-72
- Bačkor, M., & S. Loppi (2009). Interactions of lichens with heavy metals. *Biología Plantarum*, 53(2): 214-222.
- Ballesteros, T. & M.E. Ron (1985). Contribución al estudio de la flora briológica de la ciudad de Toledo. *Anales Jardín Botánico de Madrid* 42(1): 87-91
- Bancroft, J.D. & A. Stevens (1982). Theory and practice of histological techniques, Ed. 2. Churchill Livingstone, Londres, Reino Unido.
- Barkman, J.J. (1969). The influence of air pollution on bryophytes and lichens. En: *Air pollution. Proceedings of the First European Congress on the Influence of Air Pollution on Plants and Animals*. Center for Agriculture Publishing and Documentation. Wageningen, Holanda: 197–209.
- Bellinger, E.G. & D.C. Siggie (2010). *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell.Oxford, Reino Unido
- Belnap, J. & O.L. Lange (2003). *Biological soil crust: Structure, function, and management*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Belnap, J., S.L. Phillips & T. Troxler (2006). Soil lichen and moss cover and species richness can be highly dynamic: the effects of invasion by the annual exotic grass *Bromus tectorum*, precipitation, and temperature on biological soil crusts in SE Utah. *Applied Soil Ecology*, 32(1), 63-76.
- Berthier, J. (1970). Organisation à l'aisselle des feuilles chez les Bryophytes. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 117(1), 171-182.

- Berthier, J., E.J. Bonnot, M.C. Fabre & C. Héban (1974). L'appareil sécréteur des Bryales: données morphologiques, ultrastructurales et cytochimiques. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 121(2), 97-100.
- BOCM (2006). Orden 2770/2006, de 11 de agosto, del Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la Comunidad de Madrid. BOCM 204 (28 agosto 2006): 29-30.
- Bosch-Roig, P., D. Barca, G.M. Crisci & C. Lalli (2013). Lichens as bioindicators of atmospheric heavy metal deposition in Valencia, Spain. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 70(4): 373-388.
- Bravo-Gómez, M.E., A. Espinoza-Guillén, S. Castillo & N. Barba (2015). Metalochaperonas: escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos. *Educación Química*, 26(1): 26-37.
- Brown, D.H. & J.M. Wells (1990). Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Annals of Botany*, 66(6): 641-647.
- Buch, H. (1945). Über die Wasser- und Mineralstoffversorgung der Moose (I) *Commentationes Biologici Societas Scientiarum Fennicae*, 9(16):1
- Cai, Q.Y., C.H. Mo, Q.T. Wu, A. Katsoyiannis & Q.Y. Zeng (2008). The status of soil contamination by semivolatile organic chemicals (SVOCs) in China: a review. *Science of the Total Environment*, 389(2), 209-224.
- Carginale, V, S. Sorbo, C. Capasso, F. Trinchella, G. Cafiero & A. Basile (2004). Accumulation, localization and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma*, 223(1): 53-61.
- Casas-García, S., & A.R. Burgaz (2002). Contribución al catálogo de la flora terrícola acidófila (líquenes y briófitos) de la provincia de Madrid (España). *Botanica Complutensis*, 26, 009-015.
- Castillo-Monroy, A.P. & F.T. Maestre (2011). Biological soil crusts: Recent advances in our knowledge of their structure and ecological function. *Revista chilena de historia natural*, 84(1), 1-21.
- Chettri, M.K., T. Sawidis, G.A. Zachariadis & J.A. Stratis (1997). Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia thalli*. *Environmental and Experimental Botany*, 37(1): 39-52.

- Clark, S.E., R. Pitt & P.E. Richard Field (2010). Groundwater contamination potential from infiltration of urban stormwater runoff. In *Effects of Urbanization on Groundwater: An Engineering Case-Based Approach for Sustainable Development*. ASCE, Estados Unidos: 119-164.
- Cuizano, N.A., & A.E. Navarro (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Anales de Química*, 104(2): 120-125.
- Cunningham, S.D. & D.W. Ow (1996). Promises and prospects of phytoremediation—update on biotechnology. *Plant Physiology*. 110, 715–719.
- DeLuca, T. H., O. Zackrisson, F. Gentili, A. Sellstedt & M.C. Nilsson (2007). Ecosystem controls on nitrogen fixation in boreal feather moss communities. *Oecologia*, 152(1), 121-130.
- Dickinson, N.M. & N.W. Lepp (1997). Metals and trees: impacts responses to exposure and exploitation of resistance traits. In: R. Prost (Ed.), *Contaminated Soils*. INRA, Paris.
- Dierßen, K. (2002). Distribution, ecological amplitude and phytosociological-characterization of European bryophytes. *Nova Hedwigia*, 74(3-4).
- Domínguez, D. (1890). *Planos del distrito minero de la provincia de Madrid. Volumen II (146-359)*. Madrid: Consultado en la Dirección General de Industria, Energía y Minas.
- Elvira, N.J., I. Draper & B. Estébanez (2015a). *Briófitos asociados a minas de cobre en la Sierra Norte de la Comunidad de Madrid*. Anales del XX Simpósio de Botânica Criptogâmica, Oporto, Portugal.
- Elvira, N.J., I. Draper & B. Estébanez (2015b). *Briófitos asociados a minas de cobre en la Sierra Norte de la Comunidad de Madrid: efectos sobre su diversidad y desarrollo*. Libro de resúmenes de XXI Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Burgos, España. P 43.
- Fernández, J. A., M.T. Boquete, A. Carballeira & J.R. Aboal (2015). A critical review of protocols for moss biomonitoring of atmospheric deposition: Sampling and sample preparation. *Science of The Total Environment*, 517, 132-150.
- Flury, M. (1996). Experimental evidence of transport of pesticides through field soils—a review. *Journal of environmental quality*, 25(1), 25-45.

- Francke, J. A. & H. Hillebrand (1980). Effects of copper on some filamentous chlorophyta. *Aquatic Botany*, 8, 285-289.
- Galán, E. & A. Romero (2001) Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla: Revista de la Sociedad Española de Mineralogía* 10: 48--60
- Glime, J.M. (2007a). *Bryophyte ecology, Vol. 1 Physiological Ecology*. Publicado online, disponible en: <http://www.bryoecol.mtu.edu>.
- Glime, J.M. (2007b). Economic and ethnic uses of bryophytes. *America Editorial Committee. Flora of North America*, 27: 14-41.
- Guerra, J., M. Burgués, M.J. Cano & R.M. Cros (eds.) (2010). *Flora Briofítica Ibérica. Volumen IV*. Murcia: Sociedad Española de Briología.
- Guschina, I.A. & J.L. Harwood (2002). Lipid metabolism in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. from lead-contaminated and non-contaminated populations. *Journal of Experimental Botany*, 53(368): 455-463.
- Harmens, H., D.A. Norris, E. Steinnes, E. Kubin, J. Piispanen, R. Alber, Y. Aleksiyenak, O. Blum, M. Coskun, M. Dam, L. De Temmerman, J.A. Fernandez, M. Frolova, M. Frontasyeva, L. Gonzalez-Miqueo, K. Grodzinska, Z. Jeran, S. Korzekwa, M. Krmar, K. Kvietkus, S. Leblond, S. Liiv, S.H. Magnusson, B. Mankovska, R. Pesch, Ä. Ruhling, J.M. Santamaria, W. Schroder, Z. Spiric, I. Suchara, L. Thöni, V. Urumov, L. Yurukova & H.G. Zechmeister (2010). Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: spatial patterns and temporal trends in Europe. *Environmental Pollution*, 158(10), 3144-3156
- Harmens, H., D.A. Norris, K. Sharps, G. Mills, R. Alber, Y. Aleksiyenak, ... & A. Ene (2015a). Heavy metal and nitrogen concentrations in mosses are declining across Europe whilst some “hotspots” remain in 2010. *Environmental Pollution*, 200, 93-104.
- Harmens, H., W. Schröder, H.G. Zechmeister, E. Steinnes & M. Frontasyeva (2015b). Comments on JA Fernandez, MT Boquete, A. Carballeira, JR Aboal (2015). A critical review of protocols for moss biomonitoring of atmospheric deposition: Sampling and sample preparation. *Science of the Total Environment* 517: 132-150. *The Science of the total environment*, 538, 1024.
- Hart, B.A. & B.T. Scaife (1977). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Research* 14(3): 401-413.

- Havlicek, E. (2012). Soil biodiversity and bioindication: from complex thinking to simple acting. *European Journal of Soil Biology*, 49, 80-84.
- Hernández-Colorado, R.R., A.L. Alvarado & R.M. Romero (2012). Acumulación de cobre en plantas silvestres de zonas agrícolas contaminadas con el metal. *Ciencia y Tecnología*, 28(1, 2): 55-61.
- Holt, E.A. & S.W. Miller (2011). Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 8.
- International Association for Standardization (ISO) (1995). *Soil Quality; Extraction of trace elements soluble in aqua regia*. International Association for Standardization, International Standard 11466:1995 E, 6 p.
- Jordá, L. (2008). *La minería de los metales en la provincia de Madrid: Patrimonio minero y puesta en valor del espacio subterráneo*. (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Politécnica de Madrid
- Jordá, L., O. Puche & L.F. Mazadiego (2005). *La minería de los metales y la metalurgia en Madrid (1417-1983)*. Madrid: Instituto Geológico y Minero de España. Series Recursos Minerales: nº 7.
- Kaúrichev I. S., N. P. Panov., M. V. Stratonóvich y I. P. Grechin. 1980. Prácticas de Edafología. Mir. Moscú: pp 276.
- Khan, S., Q. Cao, Y.M. Zheng, Y.Z. Huang & Y.G. Zhu (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution*, 152(3), 686-692.
- Kremer, C., F. Pettolino, A. Bacic & A. Drinnan (2004). Distribution of cell wall components in *Sphagnum* hyaline cells and in liverwort and hornwort elaters. *Planta* 219: 1023–1035.
- Lepp, N.W. & D. Salmon. (1999). A field study of the ecotoxicology of copper to bryophytes. *Environmental Pollution*, 106(2), 153-156.
- Lindo, Z. & A. Gonzalez (2010) The bryosphere: an integral and influential component of the Earth's Biosphere. *Ecosystems* 13: 612—627.
- MAPA (1994). *Metodos oficiales de análisis (M.O.D.A.)*. Ministerio de Agricultura, pesca, y Alimentación. Madrid.
- Markert, B.A. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 77-82.

- Markert, B.A., A.M. Breure & H.G. Zechmeister (Eds.). (2003). *Bioindicators & biomonitors: principles, concepts, and applications* (Vol. 6). Gulf Professional Publishing.
- Markus, J. & A.B. McBratney (2001). A review of the contamination of soil with lead: II. Spatial distribution and risk assessment of soil lead. *Environment international*, 27(5), 399-411.
- Mazimpaka, V., J. Vicente & E. Ron (1988). Contribución al conocimiento de la brioflora urbana de la ciudad de Madrid. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 45(1): 61-73.
- McFarlane, H.E., D. Gendre & T.L. Western (2014). Seed coat ruthenium red staining assay. *Bio-protocol* 4(7): 1096
- Nomura, T. & S. Hasezawa (2011). Regulation of gemma formation in the copper moss *Scopelophila cataractae* by environmental copper concentrations. *Journal of plant research*, 124(5), 631-638.
- Oliva Alonso, R. (2001) Brioflora urbana de la ciudad de Córdoba (España). *Boletín de la Sociedad Española de Briología* 18-19: 121-126.
- Panda, S.K. & S. Choudhury (2005). Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(2), 191-197.
- Peres, A.E.C., E.M. Coelho & A.C. Araujo (1980). Flotação, espessamento, deslamagem e floculação seletiva. En: E.M. Coelho (Coord.) *Tratamento de Minérios e Hidrometalurgia*. Recife: ITEP-CNPq. 205-286.
- Proctor, M.C.F. (1979). Surface wax on the leaves of some mosses. *Journal of Bryology*, 10(4), 531-538.
- Puckett, K.J. (1988). Bryophytes and lichens as monitors of metal deposition. *Bibliotheca Lichenologica*, 30: 231-267.
- Puga, S., M. Sosa, T. Lebgue, C. Quintana & A. Campos (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5(1, 2): 149-155.

- Rams, S., R.M. Ros, M.J. Cano & J. Guerra (2000). Brioflora urbana de la ciudad de Murcia (SE península Ibérica) *Boletín de la Sociedad Española de Briología*, 17: 9-18.
- Rodríguez, P., M.J. Lema, G. González & S.G. Pimentel (2005). Evaluación del reactivo Mehlich 3 como extractante multielemental. In *V Congreso Ibérico de Ciências Hortícolas; IV Congreso Iberoamericano de Ciências Hortícolas*: (pp. 449-455). Associação Portuguesa de Horticultura.
- Rousk, K., D.L. Jones & T.H. DeLuca. 2013. Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 4: 150.
- Sabovljević M. & S. Grdović (2009). Bryophyte diversity within urban areas: Case study of the city of Belgrade (Serbia). *International Journal of Botany*, 5(1): 85-92.
- Sabovljević, M., V. Vukojević, A. Sabovljević, N. Mihajlović, G. Dražić & Ž. Vučinić (2007). Determination of heavy metal deposition in the county of Obrenovac (Serbia) using mosses as bioindicators. III. Copper (Cu), iron (Fe) and mercury (Hg). *Archives of Biological Sciences*, 59(4): 351-361.
- Satake, K. (2013). 銅ゴケの不思議 [El misterio de los briófitos del cobre]. Tsukuba, Japón: Iseb.
- Satake, K., K. Shibata, M. Nishikawa & K. Fuwa (1988). Copper accumulation and location in the moss *Scopelophila cataractae*. *Journal of Bryology*, 15(2): 353-376.
- Schade, C. & D. Pimentel (2010). Population crash: prospects for famine in the twenty-first century. *Environment, Development and Sustainability*, 12(2): 245-262.
- Schröder, W., M. Holy, R. Pesch, H. Harmens, I. Ilyin, E. Steinnes, ... & M. Dam (2010). Are cadmium, lead and mercury concentrations in mosses across Europe primarily determined by atmospheric deposition of these metals?. *Journal of Soils and Sediments*, 10(8), 1572-1584.
- Schröder, W., R. Pesch, S. Schönrock, H. Harmens, G. Mills & H. Fagerli (2014). Mapping correlations between nitrogen concentrations in atmospheric deposition and mosses for natural landscapes in Europe. *Ecological Indicators*, 36, 563-571.

- Shakya, K., M.K. Chettri & T. Sawadis (2008). Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(3): 412-421.
- Sharma, R.K., M. Agrawal & F. Marshall (2007). Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 258-266.
- Smaw, S.G. & R.L. Petersen (2005). Effects of simulated rain and cement amendments on protonematal growth of the urban moss, *Bryum capillare*, in culture. *The Bryologist*, 108(2), 236-240.
- Soria, A. (1993). *Ensayo para una caracterización de briófitos como indicadores de urbanización mediante el estudio de la brioflora de ciudades españolas*. (Tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Takenaka, A. & K. Satake (1991). Wave-like protonemal colonies of the moss *Scopelophila cataractae* and their consequences in light capture. *Journal of bryology*, 16(3), 429-436.
- Thomas, W.H. & D.L. Seibert (1977). Effects of copper on the dominance and the diversity of algae: controlled ecosystem pollution experiment. *Bulletin of Marine Science*, 27(1), 23-33.
- Tyler, G. (1990) Bryophytes and heavy metals: A literature review. *Botanical journal of the Linnean Society* 104:231–253
- Volke, T., J.A. Velasco & D.A. de la Rosa (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Instituto Nacional de Ecología. Coyoacan, México.
- Vukojević, V., M. Sabovljević & S. Jovanović (2005). Mosses accumulate heavy metals from the substrata of coal ash. *Archives of Biological Sciences*, 57(2), 101-106.
- Walkey, A. & J. Black (1947). A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soil. *Soil science* 63(25), 1-263.
- Wang, J.J., D.L. Harrell & R.E. Henderson (2004). Comparison of soil-test extractants for phosphorus, potassium, calcium, sodium, zinc, copper, manganese and iron in Louisiana soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 35, 145-160

- Weisło, E. (1998). Soil contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Poland-a review. *Polish journal of Environmental studies*, 7(5), 267-272.
- Whitehouse, H.L.K. (1980). The production of protonemal gemmae by mosses growing in deep shade. *Journal of Bryologist* 11:133–138
- Wong, M.H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50(6): 775-78.