

Servicio de Investigación sobre Biomonitorización de Contaminación por Metales Pesados en el Área Metropolitana de Logroño

Javier Martínez Abaigar
Encarnación Núñez Olivera
Rafael Tomás Las Heras
Laura Monforte López
Gonzalo Soriano Sancha
M^a Ángeles del Castillo Alonso
Alejo Carballeira Ocaña
Jesús Aboal Viñas
**José Ángel Fernández
Escribano**



Servicio de Investigación sobre Biomonitorización de Contaminación por Metales Pesados en el Área Metropolitana de Logroño



MARTINEZ
ABAIGAR
JAVIER -
16532287W

Firmado digitalmente por
MARTINEZ ABAIGAR JAVIER -
16532287W
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=16532287W,
sn=MARTINEZ ABAIGAR,
givenName=JAVIER,
cn=MARTINEZ ABAIGAR JAVIER -
16532287W
Fecha: 2018.12.11 18:39:53
+01'00'

Logroño, 2018

Índice*

1. Introducción	1
1.1. Marco legislativo de la calidad del aire en Europa y España, y sus limitaciones	1
1.2. Los biomonitores como instrumentos adecuados para el cumplimiento óptimo de la legislación	5
1.3. Reseña ecotoxicológica de los contaminantes evaluados en el presente estudio	10
2. Objetivos	21
3. Materiales y Métodos	22
3.1. Biomonitores utilizados.....	22
3.2. Cultivo del clon de <i>Sphagnum palustre</i>	22
3.3. Preparación de las esferas de musgo	23
3.4. Mallas de muestreo: <i>Mossphere</i> ®	23
3.5. Mallas de muestreo: aligustre.....	25
3.6. Análisis químico.....	27
3.7. Tratamiento de datos y análisis estadísticos	30
3.8. Valoración del aligustre como filtro verde.....	32
3.9. Autorizaciones.....	32
4. Resultados	33
4.1. Análisis de metales pesados en <i>Mossphere</i> ®	33
4.2. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en <i>Mossphere</i> ®	37
4.4. Correlaciones entre las variables obtenidas en <i>Mossphere</i> ® y análisis multivariante	40
4.5. Análisis de metales pesados en aligustre.....	42
4.6. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en aligustre.....	45
4.7. Análisis de Nitrógeno y $\delta^{15}\text{N}$ en aligustre	46
4.8. Medidas fisiológicas no destructivas en aligustre	47
4.9. Correlaciones entre las variables obtenidas en aligustre y análisis multivariante	50
4.10. Análisis de estructura espacial en las variables analizadas (semivariogramas)	52
4.11. Medidas de Índice de Área Foliar (LAI) en aligustre y valoración como filtro verde	53
4.12. Comparación entre los dos biomonitores utilizados: <i>Mossphere</i> ® vs. aligustre	54
5. Conclusiones	56
6. Agradecimientos	61
7. Referencias bibliográficas	62
ANEXO I: Tablas.....	
ANEXO II: Figuras.....	
ANEXO III: Informe Control Calidad Analítica.....	

* Todas las Tablas a las que se alude en el texto están incluidas en el Anexo I, y todas las Figuras en el Anexo II.

1. Introducción

1.1. Marco legislativo de la calidad del aire en Europa y España, y sus limitaciones

El marco regulador para la elaboración de los planes y programas nacionales, autonómicos y locales para la mejora de la calidad del aire queda establecido en la Directiva Marco 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa (transpuesta a la legislación española a través del Real Decreto 102/2011, de 28 enero, relativo a la mejora de la calidad del aire), junto con la Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente. Más recientemente, la Directiva 2015/1480 de la Comisión de 28 de agosto de 2015 modifica varios anexos de las Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, que afectan a las normas relativas a los métodos de referencia, la validación de datos y la ubicación de los puntos de muestreo para la evaluación de la calidad del aire ambiente.

La legislación citada establece que todos los Estados miembros deben evaluar y gestionar la calidad del aire ambiente, teniendo en cuenta entre otros contaminantes: plomo (Pb), cadmio (Cd), arsénico (As), níquel (Ni), mercurio (Hg), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), y amoniaco. La evaluación de dicha calidad debe tener en cuenta el tamaño de las poblaciones y los ecosistemas expuestos a la contaminación atmosférica. Procede por lo tanto clasificar el territorio de los Estados miembros por zonas o aglomeraciones que reflejen la densidad de población.

Específicamente, la Directiva Marco 2008/50/CE pretende definir y establecer objetivos de calidad del aire ambiente para evitar, prevenir o reducir los efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente en su conjunto, así como evaluar la calidad del aire ambiente en los Estados miembros basándose en métodos y criterios comunes, obtener información sobre la calidad del aire ambiente con el fin de ayudar a combatir la contaminación

atmosférica y otros perjuicios, controlar la evolución a largo plazo y las mejoras resultantes de las medidas implementadas, asegurar que esa información sobre calidad del aire ambiente se halla a disposición de los ciudadanos, y mantener y/o mejorar la calidad del aire.

El Real Decreto 102/2011 aúna las vigentes Directivas Europeas en materia de calidad del aire, la Directiva 2008/50/CE y la Directiva 2004/107/CE, y las traspone a la legislación española, sirviendo de marco regulador para la elaboración de los planes y programas nacionales, autonómicos y locales para la mejora de la calidad del aire. Este Real Decreto define y establece objetivos de calidad del aire, de acuerdo con el anexo III de la Ley 34/2007, con respecto a las concentraciones de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas, plomo, benceno, monóxido de carbono, ozono, arsénico, cadmio, níquel y benzo(a)pireno en el aire ambiente. Además, regula la evaluación, el mantenimiento y la mejora de la calidad del aire en relación con las sustancias enumeradas anteriormente y los HAP distintos al benzo(a)pireno (como mínimo benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno y dibenzo(a,h)antraceno), y establece métodos y criterios comunes de evaluación de sus concentraciones, incluida la definición de valores y umbrales que determinan los procedimientos de evaluación (medidas directas, modelización, campañas de mediciones representativas, mediciones indicativas o investigaciones, o una combinación de estos métodos). En todo caso, las técnicas de evaluación deberán permitir la identificación de la variación geográfica y las tendencias a largo plazo de los contaminantes. Finalmente, el Real Decreto determina la información a la población y a la Comisión Europea sobre las concentraciones y los depósitos de las sustancias mencionadas, el cumplimiento de sus objetivos de calidad del aire y los planes de mejora, todo ello con la finalidad de evitar, prevenir y reducir los efectos nocivos de los contaminantes sobre la salud humana, el medio ambiente en su conjunto y demás bienes de cualquier naturaleza. En este sentido, las Administraciones implicadas deberán demostrar que se aplican todas las medidas necesarias que no generen costes desproporcionados para cumplir los valores objetivo de los contaminantes.

En resumen, la evaluación y gestión de la calidad del aire en relación con los contaminantes mencionados implica, según el Real Decreto 102/2011, que se debe: 1) definir y establecer

objetivos de calidad del aire; 2) regular la evaluación, el mantenimiento y la mejora de esta calidad; 3) establecer métodos y criterios comunes de evaluación de las concentraciones de los contaminantes; y 4) determinar la información a la población y a la Comisión Europea sobre las concentraciones y los depósitos de éstos, así como sobre el cumplimiento de los objetivos marcados de calidad del aire y los planes de mejora. Todo ello tiene la finalidad de evitar, prevenir y reducir los efectos nocivos de los contaminantes mencionados sobre la salud humana, el medio ambiente en su conjunto y demás bienes de cualquier naturaleza.

Así mismo, el Reglamento (CE) Nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP) y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE, abunda en la regulación de este tipo de contaminantes, entre los que menciona específicamente los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). El objetivo que pretende este instrumento jurídico es reducir al mínimo posible los COP mediante diversas medidas, así como establecer programas y mecanismos que permitan ofrecer de forma periódica datos de vigilancia sobre su presencia en el medio ambiente.

En resumen, la legislación vigente marca el objetivo de mantener buenos niveles de calidad del aire o mejorarlo, lo que implica realizar un seguimiento y evaluación periódicos de las diferentes zonas, y obliga a los Estados miembros a disponer de información actualizada sobre la calidad del aire de su territorio y a procurar que el público tenga conocimiento de ella. Sin embargo, la determinación en el aire de los contaminantes indicados presenta grandes dificultades técnicas y un elevado coste si se aplican las técnicas analíticas clásicas. En efecto, para el cumplimiento de la legislación vigente se suele recurrir a la utilización de las estaciones de las redes de vigilancia urbana y peri-urbana. Sin embargo, éstas solo informan sobre las concentraciones de contaminantes como SO_2 , NO_x , NO , NO_2 , CO , O_3 , partículas (PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$), benceno, tolueno y xileno. Para el resto de contaminantes incluidos en las Directivas se presentan dificultades técnicas, acompañadas del elevado coste de los análisis de microcontaminantes en el aire. Además, se debe tener en cuenta que para la realización de una correcta zonificación se requiere un exhaustivo conocimiento de los niveles de emisión/inmisión en todo el territorio, del que no se dispone debido a la escasa densidad de la mayoría de las redes de medición actuales. En general, son pocas las estaciones de medición de la calidad del aire, y rarísimas las que miden microcontaminantes. Su escasa representatividad espacial es debida, fundamentalmente, a

su baja densidad. En La Rioja existen cinco estaciones de vigilancia de calidad del aire que miden los parámetros mencionados, todas ellas situadas en el valle riojano (<https://www.larioja.org/medio-ambiente/es/atmosfera/calidad-aire/estaciones-medicion>).

De ellas, una se encuentra en la ciudad de Logroño (Logroño-Cigüeña).

En el último informe periódico que España remitió a la Comunidad Europea sobre calidad del aire, correspondiente a 2016, se incluyeron datos de los citados contaminantes (SO₂, NO_x, NO, NO₂, CO, O₃, partículas (PM₁₀ y PM_{2,5}), benceno, tolueno y xileno), más As, Cd, Ni, Pb y B(a)P (que se miden con menor frecuencia temporal, concretamente mensual), así como mediciones indicativas de las concentraciones de otros HAP distintos al B(a)P y de mercurio en aire ambiente y particulado (MAPAMA, 2017). No aparecen datos de La Rioja para metales ni para otros HAP distintos del B(a)P.

Las limitaciones que se han descrito anteriormente en relación con las redes convencionales aconsejan desarrollar métodos nuevos y complementarios para la evaluación de la calidad del aire.

1.2. Los biomonitores como instrumentos adecuados para el cumplimiento óptimo de la legislación

Como ya se comentó, las dificultades técnicas que existen para evaluar la calidad del aire y la presencia de microcontaminantes, así como su elevado coste, la escasa información existente y la imprecisión de los modelos basados en emisiones, aconsejan la adopción de nuevos métodos de evaluación que complementen a los tradicionales de naturaleza fisicoquímica. Entre los métodos alternativos se encuentra el uso de biomonitores, organismos que presentan efectos mensurables tras ser expuestos a los contaminantes. Esta técnica es una opción prometedora a la hora de cumplir las exigencias establecidas en la legislación vigente, ya que es una herramienta económica, que integra las variaciones temporales de la calidad del aire y permite disponer al mismo tiempo de una información con una resolución espacial precisa. En el caso de metales pesados, la biomonitorización está avalada por el grado de implantación a nivel europeo de la red de biomonitorización transfronteriza (*Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe*). En este sentido, España suscribió dos protocolos referentes a la contaminación a larga distancia o transfronteriza [*Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution*], dentro de la *Environment and Human Settlements Division (United Nations Economic Commission for Europe, UNECE)*: el Programa Europeo de Monitorización y Evaluación, o EMEP (1984), y la red *Heavy Metals* (Aarhus 1998). La red *Atmospheric Heavy Metal Deposition in Europe* fue creada para controlar la eficacia de las medidas adoptadas dentro de las coordenadas de la mejor tecnología disponible (BAT). Dentro de ella, la Red de Muestreo de Metales Pesados en Musgos (*Heavy Metals in Mosses Survey*) suministra datos sobre la concentración de metales pesados en musgos de hasta 40 países, como una medida de entrada de estos contaminantes en los ecosistemas y su impacto sobre el ambiente y la salud humana (Harmens *et al.*, 2016). Por otra parte, existe abundante documentación científica (Harmens *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2010, 2011, 2012, 2013a, 2013b, 2013c, 2015a, 2015b, 2016) que demuestra la validez de los musgos y otros organismos para biomonitorizar la calidad del aire en relación con diversos contaminantes, y por lo tanto para optimizar el cumplimiento de la legislación vigente.

Además, el uso de biomonitores como método de evaluación de la contaminación está reconocido en la Ley 34/2007, de 15 de noviembre, de Calidad del aire y protección de la atmósfera, ya que establece que las Comunidades Autónomas deberán disponer de estaciones de medida u otros sistemas de evaluación de la calidad del aire que sean suficientes para permitir el cumplimiento de sus obligaciones.

Por otra parte, los datos suministrados por los biomonitores son adecuados para la presentación y manejo de la información obtenida en cuanto a localización de las muestras, información general (clima, geología, topografía, etc.), características especiales, etc. Los biomonitores cumplen todos estos requerimientos informativos ya que permiten:

- Realizar una evaluación objetiva, precisa, económica e integradora de la variabilidad temporal en relación con la calidad del aire, al reflejar la deposición atmosférica de microcontaminantes confiriendo una elevada representatividad espacio-temporal a todo el territorio muestreado.
- Localizar zonas o situaciones de rebasamiento de niveles peligrosos.
- Estimar la superficie contaminada, y apreciar mediante la cartografía de los resultados las diferencias de calidad del aire en el territorio muestreado, zonificando éste en función de los niveles obtenidos y la densidad de muestreo utilizada.
- Realizar una evaluación preliminar de la calidad del aire ambiente que mitigue la escasa información disponible sobre la calidad del aire en la mayor parte de los territorios.
- Acometer evaluaciones posteriores mediante campañas periódicas, para realizar un seguimiento de los contaminantes a lo largo del tiempo a diferentes escalas y discriminar las áreas que mantienen una buena calidad del aire de las que se han recuperado o empeorado.
- Identificar el origen de la contaminación, dependiendo de la escala de muestreo utilizada, mediante muestreos orientados en determinadas localizaciones (por ejemplo el entorno de posibles focos de contaminación, o instalaciones recientes o modificadas).
- Definir objetivos sobre la calidad del aire por parte de las Administraciones implicadas, en función de los resultados obtenidos, delimitando por ejemplo las zonas calientes donde se centrarían los planes de remediación.

- Verificar la eficiencia de planes o programas de remediación, o la implantación de nuevas tecnologías ambientales, así como vigilar que las zonas de buena calidad del aire se mantengan como tales.
- Presentar la calidad del aire ambiente de forma rigurosa, clara, comprensible y accesible para el público, gracias a las posibilidades cartográficas y de modelización de los datos obtenidos.
- Evaluar una gran diversidad de contaminantes, incluidos metales, metaloides, HAP, PCB, dioxinas, furanos, etc., de manera individualizada e independiente.
- Integrar la información de todos los contaminantes evaluados mediante la construcción de índices apropiados.

Por lo tanto, la biomonitorización es un método reconocido internacionalmente que permite estimar los niveles de contaminantes en el aire ambiente, y la concentración de un contaminante en el biomonitor es indicativa de la deposición atmosférica del contaminante en la zona. En el ámbito de la biomonitorización, los musgos presentan numerosas ventajas por sus peculiares características fisiológicas, que les permiten acumular eficientemente diversos contaminantes, especialmente metales pesados y HAP. Así mismo, algunas plantas ornamentales comunes en las ciudades, como el aligustre (*Ligustrum lucidum*), se han utilizado como biomonitores de contaminación urbana. Sus hojas perennes le permiten acumular contaminantes en las épocas en que éstos se producen en mayor cantidad, que coinciden habitualmente con los meses invernales. Los biomonitores tienen una cobertura geográfica mucho mayor que la que se puede conseguir mediante análisis fisicoquímicos, y acumulan contaminantes en concentraciones más fácilmente detectables. Además, los biomonitores en general, y los musgos en particular, pueden utilizarse para controlar un gran espectro de contaminantes, de tal forma que pueden ser analizados unos u otros según las exigencias de la legislación y las particularidades de cada zona o localidad (Guidotti *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Zechmeister *et al.*, 2006; Galuszka, 2007; Ares *et al.*, 2009; Harmens *et al.*, 2013c; Gusev *et al.*, 2014; Vukovic *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Foan *et al.*, 2014, 2015; Capozzi *et al.*, 2016a, 2016b, 2017a, 2017b). Por otro lado, las bioconcentraciones observadas en los musgos se pueden utilizar como una medida de exposición de la población humana a los contaminantes atmosféricos, lo que facilita la realización de estudios epidemiológicos y evaluaciones de riesgo (Wolterbeek y Verburg,

2004). Además, cuando hay suficiente información disponible sobre análisis de microcontaminantes en aire (depositación total o en partículas) es posible, mediante intercalibración o modelización, establecer correspondencias entre los niveles y umbrales de contaminantes recogidos en la legislación y los niveles de microcontaminantes en los musgos.

Más específicamente, diversos estudios confirman la validez de los musgos terrestres como biomonitores de la calidad del aire en relación con metales pesados y metaloides (ver por ejemplo Harmens *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2010, 2015b). También existen estudios en relación con los HAP (Gusev *et al.*, 2014; Ilyin *et al.*, 2014), y además en la red EMEP se ha realizado un análisis preliminar de la distribución espacial de HAP mediante el uso de musgos como biomonitores, en cooperación con el programa *ICP-Vegetation (International Cooperative Programme on Effects of Air Pollution on Natural Vegetation and Crops)*: <http://icpvegetation.ceh.ac.uk/>). Las medidas de HAP en musgo se compararon con los resultados modelizados, y se encontró una correlación significativa entre los contenidos de HAP en musgo y las predicciones de los modelos para varios países, entre otros España, y por lo tanto se recomendó continuar y ampliar los estudios para analizar la variabilidad espacial de la contaminación por HAP utilizando simultáneamente los modelos y el musgo, entre otros motivos para paliar la escasez de estaciones medidoras de HAP en la red EMEP (Gusev *et al.*, 2014). De ahí que la red EMEP haya recomendado continuar con la biomonitorización de metales pesados y HAP mediante musgos en paralelo a las mediciones de la citada red para, entre otros objetivos, paliar la escasez de estaciones medidoras EMEP. De esta forma, la biomonitorización de metales pesados y HAP con musgos proporciona una información muy valiosa sobre la distribución espacial de los contaminantes y sus tendencias temporales, especialmente en áreas escasamente cubiertas por la red EMEP. Los resultados en este sentido son prometedores, ya que se han encontrado correlaciones espaciales y temporales significativas entre las concentraciones de contaminantes obtenidas en musgo y las modelizaciones EMEP realizadas (Gusev *et al.*, 2014; Ilyin *et al.*, 2014).

Por su parte, la determinación de microcontaminantes en partículas (PM₁₀ y PM_{2,5}) presenta dificultades técnicas, baja replicabilidad y un elevado coste. Hasta el momento la mayoría, no muy abundante, de la información existente en este aspecto se centra en la deposición

atmosférica total por vía húmeda, siendo la información sobre microcontaminantes en PM₁₀ muy escasa y restringida a unos pocos escenarios. Por este motivo, los biomonitores, y concretamente los musgos, surgen como una alternativa, rápida y sencilla, capaces de facilitar una evaluación objetiva de los microcontaminantes presentes en el aire de una localidad. La precisión y resolución espacial de esta información superan la que se pueda obtener con los modelos de dispersión atmosférica a escala regional, debido sobre todo a la escasa información disponible sobre la emisión de microcontaminantes. Además, cada contaminante se trata de manera individualizada, y la información suministrada es fácilmente modelizable, y puede ser reforzada o diseñada para el seguimiento y la evaluación de fuentes difusas o puntuales. En particular, los musgos se adecúan fundamentalmente a la vigilancia de microcontaminantes debido a su elevada capacidad de bioconcentración. Estos contaminantes traza son de difícil y costosa evaluación con los métodos de análisis convencionales, y no existen para ellos técnicas asequibles de monitorización continua, de las cuales sí se dispone en el caso de los macro-contaminantes.

Los dos biomonitores utilizados en el presente estudio han sido musgos y hojas de un árbol ornamental frecuentemente plantado en las ciudades (aligustre). Con respecto a los musgos, se han utilizado profusamente en biomonitorización de muy diversos tipos de contaminación atmosférica, tanto musgo nativo como trasplantes (las llamadas *moss-bags* o bolsas de musgo). Sin embargo, se han realizado menos estudios en condiciones comparables al presente trabajo, es decir, utilizando *moss-bags* en ambientes urbanos (Capozzi *et al.*, 2017a; Oishi y Hiura, 2017; Urosevic *et al.*, 2017; Avila-Perez *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018; Oishi, 2018), y aún menos utilizando un musgo clonado (Di Palma *et al.*, 2016; Capozzi *et al.*, 2017b). Con respecto a los árboles ornamentales en ambientes urbanos, esta aproximación metodológica ha sido rara, y en los pocos estudios existentes se han utilizado robinia, alcanforero, pino y roble (Capozzi *et al.*, 2017a; Huang *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018; Oishi, 2018; Xu *et al.*, 2018), pero nunca aligustre.

1.3. Reseña ecotoxicológica de los contaminantes evaluados en el presente estudio

En primer lugar hay que resaltar que, en muchos casos, existe una falta de evidencia de umbrales de toxicidad de los contaminantes a partir de los cuales se pueda tener certeza de que aparecerán efectos adversos para la salud. Esto ocurre especialmente en el caso de los contaminantes presentes en el aire, ya que para los presentes en los alimentos hay más datos. Por tanto, actualmente en muchos casos no hay datos sobre la cantidad que debe inhalarse por debajo de la cual no existen riesgos para la salud. Incluso para los casos de ingestión de contaminantes en la dieta existen importantes lagunas de conocimiento porque no se puede experimentar en humanos debido a los posibles efectos negativos, por lo que se deben utilizar otras aproximaciones o modelos para evaluar el riesgo.

Con respecto a los metales pesados, y según el Ministerio de Transición Ecológica (<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/metales.aspx>) y la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.htm), aparecen de forma natural en la corteza terrestre, pero su concentración aumenta en la atmósfera como consecuencia de diversas actividades humanas, especialmente la quema de combustibles fósiles, los trabajos metalúrgicos, la minería y la incineración de residuos, por lo que pueden penetrar en el cuerpo principalmente por inhalación. Además, se pueden encontrar también en aguas y suelos. Aunque algunos metales pesados son esenciales para la vida en concentraciones adecuadas, resultan muy nocivos por procesos de bioacumulación (aumento de concentración a lo largo de las cadenas tróficas), por lo que la ingestión de plantas o animales contaminados puede provocar intoxicaciones. Por lo tanto, en concentraciones relativamente elevadas suponen un riesgo para la salud de las personas y los ecosistemas. Además, su peligrosidad es mayor al no ser química ni biológicamente degradables, por lo que pueden permanecer en el ambiente durante períodos muy largos. La exposición a metales pesados provoca efectos muy diversos, como lesiones de mucosas y vías respiratorias (por ejemplo, asma o enfisema), problemas renales, circulatorios y digestivos, osteoporosis, anemia,

afectaciones del sistema inmunológico y la regulación endocrina, alergias, dermatitis, daños en el sistema nervioso central, y cáncer.

El origen de los metales pesados en ambientes urbanos es diverso. La presencia de antimonio (Sb), cobre (Cu) y zinc (Zn) suele atribuirse a las emisiones por abrasión de frenos y ruedas del tráfico rodado, mientras que vanadio (V) y níquel (Ni) tienen relación con la combustión de fuel-oil y coque de petróleo; la presencia de arsénico (As) y mercurio (Hg) se debe a la combustión de carbón en centrales térmicas y algunos focos industriales específicos; y plomo (Pb), cadmio (Cd) y manganeso (Mn), entre otros, están relacionados con emisiones industriales, ya que la emisión de Pb por el tráfico se ha reducido desde la implantación de combustibles sin Pb.

A continuación se hace una reseña ecotoxicológica más detallada de los contaminantes analizados en el presente estudio (ver Materiales y Métodos), basada en Reichl (2004), Nordberg *et al.* (2007) y la información suministrada por el Ministerio de Transición Ecológica (<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/calidad-del-aire/salud/metales.aspx>) y la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.htm).

Arsénico (As). Es un metaloide presente en la naturaleza en diferentes formas químicas inorgánicas y orgánicas. Las fuentes naturales de As son arseniuros y arseniatos metálicos, sulfuros minerales, gases volcánicos, fuentes geotérmicas, incendios forestales y la erosión de rocas y minerales que lo contengan, pero también puede derivar de actividades antropogénicas como emisiones industriales (por ejemplo de hornos de fundición), depósitos de desechos, estiércol de aves, vertederos de basuras, escombreras metálicas, y producción de energía a partir de combustibles fósiles (centrales térmicas de carbón u otras combustiones), así como de su uso como conservante de madera, herbicida o insecticida. Las formas inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas. La absorción prolongada de As por inhalación de partículas en suspensión que contengan este elemento produce lesiones de las mucosas y las vías respiratorias, así como daños sanguíneos, cardíacos, hepáticos y renales, además de alterar el sistema nervioso periférico y producir cáncer de vejiga, pulmón y piel. No obstante, la principal fuente de exposición de las personas es la ingestión

de alimentos y agua. Sobre el medio ambiente, es altamente tóxico para la fauna tanto terrestre (incluidas aves) como acuática, y en elevadas concentraciones en los suelos disminuye el crecimiento vegetal. La deposición atmosférica de As ha disminuido de forma general en Europa en los últimos 20 años.

Cadmio (Cd). Es un metal pesado que no posee funciones nutricionales ni fisiológicas en humanos o animales. Se encuentra de forma natural principalmente asociado a minerales de Zn, Cu o Pb, por lo que es un subproducto inevitable en las actividades mineras relacionadas con estos metales. También se puede emitir por vulcanismo. Las emisiones antropogénicas de Cd proceden de combustiones asociadas con la producción y transformación de energía, así como de la minería, la fundición, la incineración de residuos sólidos en ciudades, los lodos de depuradora, las escombreras metálicas, la industria del plástico y microelectrónica, la manufactura de baterías y los fertilizantes fosfatados. Los compuestos de Cd pueden ser absorbidos por inhalación y su toxicidad crónica se caracteriza por una degeneración de las mucosas nasofaríngeas, destrucción del epitelio olfativo, enfisema pulmonar, graves lesiones renales y cáncer. El consumo de tabaco, así como entornos laborales de riesgo, son importantes fuentes de Cd para el organismo. También se observan, por consumo de alimentos contaminados (por ejemplo, crustáceos y hongos son acumuladores naturales de cadmio), osteoporosis y anemias severas acompañadas de fuertes dolores, deformaciones del esqueleto y modificaciones de la talla. Así mismo, es muy tóxico para organismos acuáticos.

Cobre (Cu). Este elemento es esencial para los seres vivos por su papel como cofactor en diversas enzimas. El Cu y sus compuestos están presentes en la naturaleza a través de minerales (como metal libre o componente del sulfuro de Cu y la calcopirita) y erupciones volcánicas. Las emisiones antropogénicas se producen por actividades mineras, combustiones industriales, fundiciones, manufacturas de materiales de Cu, industria microelectrónica, tratamiento de la madera, depuradoras, depósitos de residuos, escombreras metálicas, y por su uso como fungicida en agricultura. No hay datos cuantitativos sobre su absorción pulmonar, y se piensa que una fuente importante de Cu para el organismo es el consumo de agua potable. La toxicidad del Cu por ingestión se manifiesta por náuseas, alteraciones gastrointestinales, hemólisis y daños hepáticos y

renales, pero se sabe poco de sus efectos por inhalación de humos industriales, que puede cursar con irritación del tracto respiratorio y daños pulmonares.

Mercurio (Hg). Forma parte de la composición natural de la corteza terrestre, principalmente como mineral de cinabrio (sulfuro de mercurio) o como impureza de otros minerales como la pirita (sulfuro de hierro). Se libera al ambiente por actividad volcánica y erosión de minerales y rocas, y también por procesos antropogénicos: industria relacionada con sus usos (pinturas, amalgamas dentales, baterías y pilas, lámparas fluorescentes y de bajo consumo, plásticos, papel, aparatos eléctricos y electrónicos, y aparatos de medida como termómetros y barómetros), minería, fundición, quema de combustibles fósiles y eliminación de residuos. Este metal se puede presentar en varias formas (Hg^0 (gaseoso y por lo tanto volátil), inorgánico como Hg^+ y Hg^{2+} , y orgánico) con distinta toxicidad. Los síntomas globales son muy diversos e incluyen temblores, eritema, estomatitis, gingivitis y alteraciones del sistema nervioso central y los sentidos (parestesia, ataxia, deficiencias auditivas y visuales), irritabilidad, insomnio, fotosensibilidad, eritema generalizado, pérdida de peso, afecciones del riñón, el hígado, el sistema inmune y el sistema reproductores, y cáncer. El feto y los niños más pequeños son los más sensibles a este metal.

Manganeso (Mn). Es un elemento esencial para humanos y animales. Se encuentra de manera natural en muchos tipos de rocas, y se libera al medioambiente por procesos de erosión y actividades humanas como la producción de acero, la industria química (como agente oxidante y para la producción de permanganato de potasio y otros productos derivados del Mn) y como aditivo en la gasolina. Además, se utiliza como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura, en los trituradores de rocas y en las agujas y cambios de vía de los ferrocarriles. También se emplea en la fabricación de cerámica, cerillas, vidrio y tintes. La dieta es la mayor fuente de Mn, pero también su exceso puede resultar tóxico por inhalación. Los síntomas son neurológicos y de comportamiento (indiferencia, apatía, astenia, somnolencia, pérdida de apetito, cefalea, vértigo, excitabilidad, dificultades de coordinación, calambres y dolor de espalda), incluyendo perturbaciones de tipo Parkinson debidas a alteraciones en los neurotransmisores. Así mismo, la inhalación produce enfermedades respiratorias como neumonía química, bronquitis e inflamación pulmonar.

Níquel (Ni). Este metal forma parte de diferentes minerales, y sus fuentes antrópicas son la combustión para producción eléctrica (sobre todo de fuel-oil y coque de petróleo), las emisiones procedentes de los motores de los buques, la industria del hierro y acero, la minería, la fundición, la manufactura metálica, solo o en aleaciones (monedas, utensilios de cocina, joyería, etc.), la fabricación de baterías, y la industria microelectrónica. La inhalación de Ni provoca displasia epitelial de las fosas nasales, reacciones alérgicas cutáneas y cáncer. También puede afectar al sistema inmune y a las funciones respiratoria y renal, y reducir la fertilidad.

Plomo (Pb). Es un componente de la galena (sulfuro de Pb), la principal mena de este metal, y otros minerales. Las actividades humanas que lo liberan al medio son minería, fundición, industria metalúrgica (por ejemplo la fabricación de municiones y protectores frente a radiaciones ionizantes), refinerías, manufactura de baterías, lodos de depuradora, plaguicidas, depósitos de residuos minerales y escombreras. Era tradicional su uso (en forma de Pb-tetraetilo) como aditivo antidetonante en las gasolinas y en la fabricación de pinturas, pero su eliminación en Europa ha reducido significativamente la contaminación por este metal. Los compuestos de Pb son absorbidos sobre todo por inhalación. La intoxicación por Pb se conoce desde antiguo y afecta potencialmente a todos los órganos y sistemas del cuerpo, y en especial al sistema nervioso, originando retraso mental, nacimientos prematuros y retrasos en el crecimiento. También provoca cólicos saturninos (cólicos secos sin diarrea), signos neurológicos, insomnio, fatiga general, apatía, estupor, agresividad, ralentización de la conducción nerviosa, temblores, anemia, ictericia, coloración grisácea de las encías, anorexia y gastralgias.

Paladio (Pd). Se encuentra en la naturaleza asociado a otros metales como platino, oro y níquel. Su liberación al ambiente es relativamente escasa, pero está aumentando por el incremento de su uso en actividades humanas como catalizador en automóviles, componente de aleaciones dentarias y en equipamientos eléctricos, rodamientos y piezas de relojería. También se utiliza como catalizador en la industria, y en la elaboración de implantes radiactivos para tratar el cáncer. La exposición al Pd es sobre todo por inhalación, y también por contacto de la piel con elementos de joyería. Los síntomas incluyen hinchamiento de los labios y las mejillas, estomatitis, afecciones liquenoides bucales, dermatitis, picores, mareos, asma y urticaria.

Platino (Pt). Es un metal muy escaso en la corteza terrestre, donde se encuentra en estado puro o mezclado con otros minerales. El Pt y sus aleaciones se utilizan como catalizadores en el refino de petróleo y la industria química, y también en el control de las emisiones de los vehículos (por lo que están aumentando las concentraciones de Pt en el entorno de carreteras y en ambientes urbanos), en los contactos eléctricos, en superficies ornamentales y reflectantes, y en joyería. El Pt produce irritaciones de los ojos, la piel y el tracto respiratorio superior, y también asma. Los fumadores tienen mayor riesgo de sensibilización al Pt.

Rhodio (Rh). Es uno de los elementos más raros de la corteza terrestre, y se encuentra en pequeñas cantidades asociado con Pt nativo y minerales de Ni-Cu. Se utiliza en recubrimientos resistentes a la corrosión para proteger los artículos de plata del ennegrecimiento, en espejos de alta reflectancia para proyectores eléctricos, para el recubrimiento de instrumentos ópticos y en las espirales de los hornos, como catalizador en diversas reacciones, en toberas para la producción de rayón y como componente de las decoraciones con oro sobre vidrio y porcelana. No existen datos experimentales significativos que indiquen problemas para la salud debidos al Rh, pero a pesar de que su toxicidad no está establecida, debe manipularse con precaución ya que el reducido número de casos de sensibilización que se han descrito puede deberse más a su poco uso que a la seguridad del metal. En ocasiones se han descrito dermatitis de contacto por manipulación de Rh.

Antimonio (Sb). Este elemento está muy relacionado con el As, con el que se combina fácilmente, y se encuentra en la naturaleza en diversos minerales que actúan como fuentes naturales, de la misma forma que la actividad geotérmica. Se utiliza en la fabricación de semiconductores, producción de aleaciones para la industria eléctrica, rodamientos, placas para baterías, soldaduras, piezas ornamentales y municiones. El Sb puede penetrar en el organismo a través de la piel, aunque la vía principal es la respiratoria. Los síntomas de una intoxicación aguda son irritación en la boca, nariz, estómago e intestino, vómitos, deposiciones sanguinolentas, alteraciones pulmonares y respiración lenta y superficial. En ocasiones se han observado casos de coma seguidos de muerte, debidos a complicaciones hepáticas y renales y al agotamiento. Los síntomas de una intoxicación crónica son sequedad de garganta, náuseas, cefalea, insomnio, pérdida de apetito y mareos. Algunos

derivados gaseosos de Sb, como la estibina (SbH_3), aparecen como subproducto de diversos procesos de la industria química, y son sumamente peligrosos ya que provocan hemoglobinuria, ictericia, anuria y muerte.

Vanadio (V). Las fuentes naturales de V son diversos minerales, relativamente escasos. Las fuentes antropogénicas incluyen los depósitos de gases de combustión de los hornos, las escorias de ferrovanadio y los óxidos de V liberados al quemar combustibles de petróleo. Su uso principal es la fabricación de herramientas de acero. Además, se utiliza en la producción de campos magnéticos, como mordientes en tintorería, catalizadores y en la industria metalúrgica. La inhalación de compuestos de V puede producir efectos tóxicos graves, que comienzan con lagrimeo profuso, sensación de ardor en la conjuntiva, rinitis, dolor de garganta, tos, bronquitis, expectoración y dolor torácico. Una exposición intensa puede producir neumonía, bronquitis crónica, cambios en el color de la lengua, y efectos sistémicos en el hígado, los riñones, el sistema nervioso, el aparato cardiovascular y los órganos formadores de sangre.

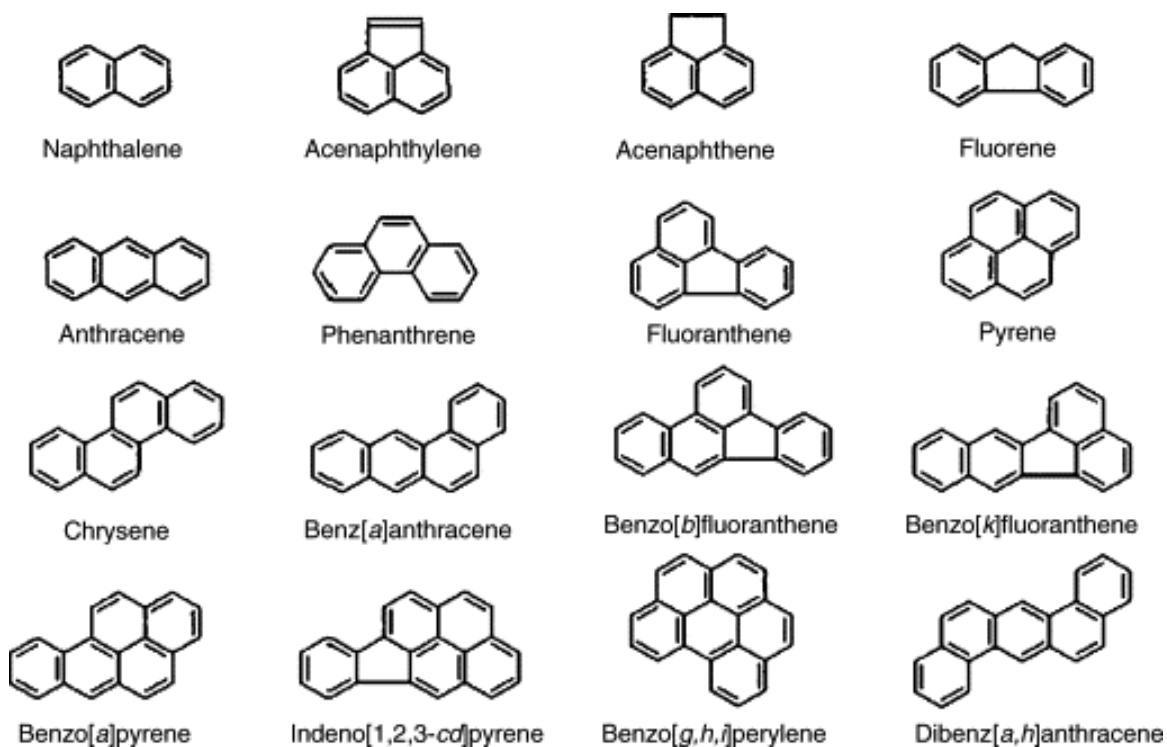
Zinc (Zn). Es un elemento esencial para los humanos porque actúa como cofactor enzimático. De manera natural se encuentra en diversos minerales ampliamente distribuidos, principalmente la blenda (ZnS). Las fuentes antropogénicas incluyen la minería y fundición, manufacturas metálicas (piezas de automóviles, equipos eléctricos, herramientas de maquinaria ligera, equipos informáticos, artículos ornamentales, planchas para tejados y cubiertas), galvanización del acero para su protección, industrias textil y microelectrónica, depósitos de residuos y escombreras metálicas, lodos de depuradora y plaguicidas. La inhalación de varios derivados del Zn produce procesos febriles parecidos a la gripe, daños pulmonares, irritaciones de los ojos y las mucosas respiratorias, bronconeumonía, náuseas, vómitos y diarrea.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Los HAP son un amplio grupo de compuestos, que consisten en dos o más anillos condensados aromáticos constituidos en su totalidad por carbono e hidrógeno. Muchos son semivolátiles, por lo que son muy móviles en el ambiente, con procesos de depósito y revolatilización que los distribuyen por el aire, el suelo y el agua. Algunos HAP son transportados a larga distancia a través de la atmósfera, lo que los convierte en un problema medioambiental transfronterizo. Las cifras

comparables y coherentes sobre la concentración de HAP en el medio ambiente en toda la Unión Europea son escasas y no permiten un análisis detallado ni de las concentraciones totales ni de las concentraciones por cada compuesto. Las cifras existentes se centran en las concentraciones de benzo-alfa-pireno (BaP), que pueden ser elevadas cerca de los grandes emplazamientos industriales y de las carreteras transitadas. Los HAP se emiten a partir de una serie de fuentes industriales, agrícolas y domésticas, y las principales contribuciones las constituyen la combustión de combustibles sólidos, la producción de aluminio, las coquerías, acerías y altos hornos, la valorización de residuos, la quema de rastrojos, el humo de tabaco, la carne preparada a la parrilla, y los gases de los escapes de los motores de gasóleo. Las fuentes naturales más importantes son los incendios accidentales y los volcanes. El BaP procedente de fuentes industriales y móviles está asociado en gran parte con la fracción PM_{2,5} mientras que el de fuentes domésticas se corresponde con partículas de mayor tamaño. Los actuales inventarios de emisiones presentan un elevado nivel de incertidumbre ya que el 75% de las emisiones proceden de fuentes difusas. Además los inventarios de las emisiones no suelen poder compararse directamente, ya que algunos se ocupan sólo del BaP, mientras que otros incluyen compuestos adicionales que no siempre están especificados. A pesar de las actuales incertidumbres acerca de los inventarios de emisiones de HAP, se prevé una reducción continuada en la emisión de la masa total, relacionada fundamentalmente con las fuentes industriales y móviles. No obstante, algunas fuentes agrícolas y naturales pueden contribuir de forma importante a incrementar los niveles de HAP en algunos lugares. Debido a las incertidumbres en los factores de la emisión, es difícil cuantificar su contribución. Desde un punto de vista analítico, solamente se miden unos pocos (ver Materiales y Métodos) o incluso se da como referencia el benzo-alfa-pireno (BaP), como recoge la Directiva sobre Aire limpio de la Unión Europea. La absorción de HAP en el cuerpo humano está ligada en gran medida a los aerosoles respirados. Los HAP afectan al desarrollo de todos los órganos y tienen efectos cancerígenos, sobre todo BaP y Dibenzo-(a,h)-antraceno en pulmón. También resultan irritantes para las vías aéreas y los ojos, producen fallos respiratorios cuando se inhalan, afectan al sistema nervioso, y a largo plazo por ingestión pueden causar problemas de coagulación y del sistema inmunitario. El tabaco representa una vía de exposición significativa en los fumadores. Como consecuencia de su baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en sustancias de naturaleza lipídica, los HAP se acumulan en los organismos y en la materia orgánica de partículas y sedimentos, pudiendo

permanecer así biodisponibles durante largos períodos de tiempo. La lentitud con que son degradados provoca su acumulación en plantas, peces e invertebrados acuáticos y terrestres, incorporándose así a la cadena alimenticia. La diferencia de persistencia de los distintos compuestos es la que va a determinar su capacidad de bioacumulación. Como regla general, la persistencia del compuesto aumenta con el tamaño de la molécula. Por ejemplo, los compuestos de bajo peso molecular, como el naftaleno, tienen una persistencia relativamente baja y una escasa capacidad de bioacumulación. Por el contrario, los compuestos de mayor peso molecular, como el BaP, son altamente persistentes y por tanto bioacumulables.

La estructura de los HAP medidos más habitualmente (ver Materiales y Métodos) se muestra a continuación:



Nitrógeno (N). El N es un elemento esencial para la vida ya que, entre otras funciones, forma parte de las proteínas y los ácidos nucleicos. Los compuestos de N están presentes en la atmósfera en formas oxidadas o reducidas. Las fuentes naturales de óxidos de N (en torno a un 30% del total) incluyen procesos biológicos del suelo y de ecosistemas acuáticos, volcanes, incendios forestales y rayos, mientras que las fuentes artificiales (el restante 70%)

son las combustiones asociadas al transporte, la industria y la producción de energía. Por su parte, las fuentes de N reducido están relacionadas primordialmente con la ganadería (producción de estiércol) y la producción y aplicación de fertilizantes en agricultura. La agricultura libera N reactivo al medio mediante la volatilización y lavado de los abonos nitrogenados, y la ganadería contribuye a este proceso a través de la volatilización de amoniaco (NH_3). Las industrias y los vehículos de combustión también producen formas de N como NO_x . Todas estas formas de N liberadas a la atmósfera pueden reaccionar químicamente y producir compuestos disueltos en agua o en forma de gases o aerosoles, como NO_3^- , NH_4^+ , HNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4NO_3 , que después pasan a la superficie terrestre por deposición seca (gravedad) o húmeda (niebla, lluvia, nieve). La población general está expuesta a los óxidos de N principalmente por actividades laborales (plantas productoras de HNO_3 o ciertos explosivos, trabajadores que sueldan metales, etc.), inhalación cerca de fuentes de combustión, como plantas de energía que queman carbón, áreas de intenso tráfico de vehículos de combustión, o viviendas que queman mucha madera o utilizan combustibles fósiles para usos domésticos. Además, el NO y el NO_2 están presentes en el humo de tabaco. Los óxidos de N pueden irritar los ojos, la nariz, la garganta, los pulmones, y posiblemente causar tos y una sensación de falta de aliento, cansancio y náusea, así como producir acumulación de líquido en los pulmones después de la exposición. Si los niveles son altos, se pueden producir quemaduras, espasmos y dilatación de los tejidos en la garganta y las vías respiratorias superiores, reduciendo la oxigenación de los tejidos del cuerpo y produciendo acumulación de líquido en los pulmones y la muerte. Por otra parte, el aumento de la deposición atmosférica de N puede provocar daños fisiológicos a las plantas y tener efectos adversos para la biodiversidad (Díaz-Álvarez *et al.*, 2018).

La relación isotópica de N $\delta^{15}\text{N}$ contribuye a la discriminación de las fuentes oxidadas o reducidas de N. Los valores menos negativos de esta relación indican la una deposición atmosférica rica en formas oxidadas (NO_x), mientras que los más negativos indican la deposición de formas reducidas (NH_y). Por ejemplo, las emisiones biogénicas del suelo tienen valores muy negativos (entre $-50\text{\textperthousand}$ y $-20\text{\textperthousand}$), como el NH_3 proveniente del suelo y los desechos animales por volatilización ($-40\text{\textperthousand}$). Por el contrario, los valores para NO_3^- y NH_4^+ varían entre $-15\text{\textperthousand}$ y $15\text{\textperthousand}$, con el primero normalmente más negativo que el segundo.

En general, los valores de la deposición húmeda en áreas rurales son menos negativos (de -7% a 1%) que en zonas urbanas (de -16% a -5%).

Además de considerar la reseña toxicológica de cada contaminante, es esencial comprender que los seres vivos estamos expuestos a una mezcla compleja y diversa de contaminantes, dada la diversidad de fuentes de contaminación naturales y antropogénicas que existen. Así mismo, los efectos de esas mezclas pueden ser más graves que los efectos simplemente aditivos de los contaminantes individuales que las componen, ya que se pueden dar interacciones entre los distintos contaminantes. En este sentido, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha establecido recientemente que la materia particulada (PM) es un potente cancerígeno, ya que las partículas finas contienen metales, HAP y otros contaminantes tóxicos, y pueden aumentar la mortalidad natural incluso a concentraciones más bajas que los umbrales definidos por la legislación europea vigente (Capozzi *et al.*, 2016a, 2016b). Sin embargo, esta legislación sólo ha establecido límites para unos pocos contaminantes (As, Cd, Ni, Pb y el HAP B(a)P), y en las estaciones de vigilancia de calidad del aire se mide el tamaño de partículas pero no su composición química. Además, la cobertura geográfica de estas medidas es insuficiente, y muchos focos locales de contaminación permanecen escondidos. Por ello, las técnicas de biomonitorización pueden ayudar a paliar estos problemas.

2. Objetivos

Dado que 1) la evaluación de la calidad del aire mediante métodos únicamente fisicoquímicos parece tener una serie de limitaciones en relación con determinados contaminantes, como metales pesados e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), y que 2) las técnicas de biomonitorización pueden complementar adecuadamente y enriquecer los métodos citados, el objetivo de la presente investigación era evaluar la calidad del aire ambiente en la ciudad de Logroño y su área metropolitana mediante el desarrollo de una Red Urbana de Biomonitorización basada en dos biomonitores de diferente naturaleza: musgo clonado trasplantado y hojas de un árbol ornamental (aligustre). En el primer caso, se ha utilizado de manera pionera en España el dispositivo *Mossphere®*, una creación original de un consorcio europeo participado por los grupos responsables del presente estudio. En el segundo caso, se ha aprovechado la frecuencia y abundancia del aligustre en la ciudad de Logroño.

Para llevar a cabo dicho objetivo, se dispusieron 84 muestras de musgo y se seleccionaron 50 ejemplares de aligustre en una distribución regular por la ciudad y su área metropolitana, y se recolectaron tras un periodo conveniente de exposición (3 meses) en época de previsible alta contaminación (febrero-mayo de 2018). En ambos tipos de biomonitores se analizaron metales pesados relacionados con la contaminación urbana, HAP y Nitrógeno. En las hojas de aligustre también se realizaron medidas no destructivas de vitalidad fisiológica para la evaluación de posibles daños debidos a la contaminación. Finalmente, se analizó el uso del aligustre como filtro verde.

Dado que la contaminación es un proceso que los ciudadanos perciben como muy negativo, y que la legislación europea y española al respecto establece que debe informarse a la sociedad sobre todo lo relacionado con la calidad del aire, un objetivo adicional del presente estudio era potenciar la divulgación y la concienciación social de la biomonitorización como un instrumento de evaluación y control de la calidad del aire para velar por la salud humana y de los ecosistemas. Al cumplimiento de este objetivo ayudó el hecho de que los biomonitores utilizados fueron claramente visibles en la ciudad durante el periodo de exposición a la contaminación, lo que facilitó el conocimiento del estudio por parte de los ciudadanos y su implicación en él.

3. Materiales y Métodos

3.1. Biomonitores utilizados

Se utilizaron dos tipos de biomonitores:

- Esferas de musgo del tipo *Mossphere*® (Figura 1), en las cuales el musgo biomonitor es un clon de *Sphagnum palustre* L. cultivado en laboratorio. Esta herramienta biotecnológica, que constituye un innovador sistema de biomonitorización de calidad del aire, se desarrolló dentro del proyecto europeo *Mossclone: Monitoring Air Quality Using Moss* (financiado por el *Seventh Framework Programme (FP7) for Research and Technological Development* de la Unión Europea) por un consorcio de Universidades, centros de investigación y empresas liderado por la Universidad de Santiago de Compostela, y del que formaban parte los grupos de investigación responsables de la realización del presente proyecto.
- Hojas de árboles ornamentales de la especie *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton (aligustre: Figura 2), que actuaban como biomonitores pasivos.

3.2. Cultivo del clon de *Sphagnum palustre*

Se empleó un medio de cultivo tipo Knop [1.84 mM KH₂PO₄; 3.35 mM KCl; 1.01 mM MgSO₄ · 7 H₂O; 4.24 mM Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O; 45 µM FeSO₄ · 7 H₂O] enriquecido con micro-elementos [50 µM H₃BO₃; 50 µM MnSO₄ · 1 H₂O; 15 µM ZnSO₄ · 7 H₂O; 2.5 µM KI, 500 nM Na₂MoO₄ · 2 H₂O; 50 nM CuSO₄ · 5 H₂O; 50 nM Co(NO₃)₂ · 6 H₂O], 1.25 mM NH₄NO₃ y sacarosa al 2% (Beike *et al.*, 2015). El medio de cultivo esterilizado (10 L), junto con ca. 100 g p.f. de clon de *S. palustre*, se introdujeron en un fotobiorreactor Applikon Biobundle que contaba con una iluminación en continuo generada por tubos LED (2FT LED T8, 8W, color 4000-4500 K) que proporcionan 210 µmol m⁻² s⁻¹ de densidad de flujo fotónico fotosintético, a temperatura de 20 °C y con un suministro continuo de aire (0.3 vvm) (Figura 3). Tras un periodo de crecimiento de 4 semanas en condiciones axénicas, se extraía el musgo producido, se escurría y se lavaba con agua y EDTA.

Posteriormente el musgo se desvitalizaba en una estufa de tiro forzado siguiendo una rampa de temperaturas crecientes (50-80-100 °C, 8-8-8 horas). En estas condiciones, el musgo de partida se encontraba libre de contaminantes (Figura 4).

3.3. Preparación de las esferas de musgo

Las esferas de musgo (*Mossphere*®) se componen de dos esferas coaxiales huecas, la interna (\varnothing 10 cm) hecha de polietileno de alta densidad perforado y la externa (\varnothing 11 cm) hecha de una red de nylon de 2 mm de malla (Figura 1). El espacio entre las dos esferas (10 mm de espesor) se llena con 3 g del clon de musgo desvitalizado, obteniéndose una relación final de peso/superficie de la esfera de 10 mg cm⁻² (Capozzi *et al.*, 2016a, 2016b).

3.4. Mallas de muestreo: *Mossphere*®

Aunque la previsión en el Pliego de Prescripciones Técnicas era utilizar 50 esferas de musgo (*Mossphere*®), preferimos aumentar este número para incrementar la solidez estadística del estudio, por lo que la malla de muestreo final constaba de 84 esferas en total. De ellas, 78 esferas se encontraban distribuidas en una malla regular de 575 m de lado, que cubría la ciudad de Logroño y su zona periurbana inmediata (Figura 5; Tabla 1). Además, se colocaron 6 esferas adicionales (números 79-84). La esfera 79 se ubicó en la sede de la Dirección General de Calidad Ambiental y Agua, y las esferas 80-84 en puntos presumiblemente limpios de contaminación de la periferia urbana.

Las esferas se colgaron, mediante una brida plástica, de mástiles de fibra de vidrio que a su vez se sujetaban, en posición perpendicular, sobre soportes adecuados. Los soportes eran, en su inmensa mayoría, farolas de alumbrado público en el caso de la malla regular (Figura 6), y pértigas colocadas ad-hoc en el resto (Figura 7). La colocación de las esferas respetó siempre las normas pertinentes tanto de seguridad laboral como de circulación (Figura 8).

Las esferas se situaban en todos los casos a una altura de 4 m, evitando que existiese ningún objeto intermedio sobre su vertical. Los mástiles se sujetaban a los soportes mediante

abrazaderas metálicas (Figura 9), de manera que todo el sistema quedaba anclado de una manera robusta (Figura 10) que impedía su alteración salvo por actos de vandalismo. La situación de los puntos de muestreo dependía de la disponibilidad de farolas en el área estrictamente urbana y de lugares adecuados para el anclaje de las pértigas en el área periurbana. Por esta razón, en algunos casos no coincidían plenamente las coordenadas teóricas y reales de los puntos de muestreo (Tabla 1).

Las esferas se colocaron del 27 de febrero al 1 de marzo de 2018. Antes de su colocación, las esferas (libres de contaminantes) estaban guardadas en bolsas selladas al vacío (Figura 11), y solo se abrían éstas en el momento de la colocación. Las esferas se recogieron del 29 al 31 de mayo de 2018, tras un periodo de exposición a los contaminantes de aproximadamente 3 meses. Para la recogida, cada esfera se retiraba del soporte y se guardaba inmediatamente en una bolsa hermética de plástico para su transporte al laboratorio. Se registraron 3 bajas en las esferas colocadas (números 7, 74 y 84), debido a actos de vandalismo (Figura 12). Dos de las bajas correspondían a la malla regular y la tercera a las esferas adicionales.

Aparte de las 84 esferas mencionadas anteriormente, 5 esferas más (esferas control) se mantuvieron herméticamente selladas en sus bolsas originales y permanecieron almacenadas durante el periodo de exposición de las demás esferas. Al finalizar este periodo, se abrieron las bolsas selladas y las esferas control se llevaron de esta manera a todos los puntos de recogida.

Una vez en el laboratorio, se abrían las bolsas que contenían las esferas expuestas, para proceder a su secado a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo el material de musgo de cada esfera para realizar los análisis.

3.5. Mallas de muestreo: aligustre

Para establecer la malla de muestreo basada en hojas de aligustre, se hizo una prospección previa por toda la ciudad para censar los aligustres ornamentales arbóreos de la especie *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton. Este censo ascendió a un total de 2.957 individuos (Figura 13; Tabla 2).

De entre ellos se seleccionaron 50 árboles, que actuaron como biomonitores pasivos. Los árboles seleccionados se encontraban distribuidos en una malla de 500 m de lado dentro de la ciudad de Logroño, coincidente a grandes rasgos con el centro de la malla de esferas de musgo (Figura 14; Tabla 3). La situación de los puntos de muestreo finales dependía de la presencia del biomonitor, por lo que en algunos casos no coincidían completamente sus coordenadas teóricas y reales (Tabla 3). Se debe destacar que solamente se utilizaron ejemplares sanos y robustos de aligustres, todos ellos de las variedades con hojas verdes, aunque en algún caso, para cubrir huecos, se tuvo que usar algún ejemplar de hoja variegada.

Las hojas de aligustre se recolectaron simultáneamente a las esferas de musgo, del 29 al 31 de mayo de 2018. En cada árbol seleccionado, se cortaron cuatro ramas en las orientaciones N, S, E y O. Las ramas, convenientemente diferenciadas, se introducían en bolsas herméticas de plástico para su transporte al laboratorio. Una vez en éste, y en el mismo día de la recogida, se descartaban las hojas recién brotadas en la primavera y se seleccionaban únicamente las dos hojas basales de todas las ramificaciones secundarias. Estas hojas habían estado expuestas a los contaminantes durante todo el periodo en que las esferas de musgo habían estado también expuestas.

Sobre 10 de dichas hojas, diferenciando las cuatro orientaciones y mediante métodos no destructivos, se midieron las siguientes variables indicadoras de vitalidad fisiológica: fluorescencia de clorofilas (concretamente el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, F_v/F_m , mediante un fluorímetro modulado PAM 2500), y contenido en clorofilas y flavonoides (mediante un instrumento Dualex). Las medidas de clorofilas realizadas con Dualex son similares a las que estaba previsto en el Pliego de Prescripciones Técnicas

llevar a cabo con el instrumento SPAD, ya que se basan en los mismos principios tanto técnicos como fisiológicos, por lo que se prefirió en aras de la eficiencia realizarlas con Dualex. Todas estas medidas se realizaban siempre en la parte central del limbo de cada hoja, evitando los nervios principales. Las medidas con Dualex se realizaban en primer lugar y, posteriormente las hojas de cada orientación se guardaban en oscuridad hasta la mañana siguiente, cuando se media F_v/F_m .

Posteriormente a la realización de las medidas no destructivas, se mezclaron todas las hojas de cada árbol muestreado para constituir una muestra compuesta. Estas hojas se secaron al aire a temperatura ambiente (Figura 15) hasta peso constante (12 días), y después se introdujeron en bolsas selladas al vacío (Figura 16), con lo que quedaban dispuestas para los análisis.

3.6. Análisis químico

Tanto en el musgo de las esferas como en las hojas de aligustre se hicieron los mismos análisis, utilizando los mismos procedimientos. Previamente a la determinación química, el musgo y las hojas se secaron en el horno (24 h a 40 °C) y se homogeneizaron mediante el empleo de un molino Restch MM-400 (con recipientes y bolas de circonio). Se analizaron varios metales pesados relacionados con la contaminación urbana, así como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y nitrógeno.

Con respecto a los metales pesados, en el Pliego de Prescripciones Técnicas estaba previsto analizar 11 elementos: As, Cd, Hg, Ni, Pb, Cu, Sb, Pt, Pd, Rh y V. En las *Mossphere*®, la mayoría de las concentraciones determinadas de As, Pt, Pd y Rh estaban por debajo de los límites de cuantificación, por lo que no se obtuvieron resultados de estos cuatro elementos. Sin embargo, se analizaron Mn y Zn. En aligustre se obtuvieron resultados de todos los anteriores elementos salvo Pt, que también se encontraba por debajo de los límites de cuantificación de la técnica empleada.

Para los análisis de metales pesados, las muestras de musgo y hojas de aligustre (aproximadamente 0,2 g) se digirieron con 8 mL de HNO₃ (Hiperpur) y 2 mL de H₂O₂ (30%) en un horno de microondas (Ethos-1, Milestone) en recipientes de teflón a alta presión, aumentando la temperatura a 190° C durante 25 minutos y manteniendo esta temperatura durante 15 minutos. Los extractos fríos se llevaron luego a un volumen final de 25 mL con agua MilliQ. Las concentraciones de As, Cd, Ni, Pb, Cu, Sb, Pt, Pd, Rh y V en los extractos se determinaron espectrométricamente en un ICP-MS (Agilent 7700x), mientras que las de Mn y Zn mediante un AAS (Pekin Elmer 2100). En el caso del Cd, para las muestras que tuvieron concentraciones por debajo del límite de cuantificación, estas fueron redeterminadas mediante GFAAS (Perkin Elmer AAnalyst 600), de acuerdo con la metodología desarrollada por miembros del presente equipo de investigación (Barciela Alonso *et al.*, 2015), tras una suspensión con extracción por ultrasonidos. En el caso de Hg se empleó un analizador elemental (Milestone DMA 80) en el que se introducía directamente el material homogeneizado y seco.

Con respecto a los HAPs, en las *Mossphere*[®] se analizaron los 16 compuestos contemplados por la *Environmental Protection Agency* (EPA) de los Estados Unidos: Acenafteno (Ace), Antraceno (Ant), Benzo[a]antraceno (BaAnt), Benzo[a]pireno (BaPyr), Benzo[b+j]fluoranteno (BbjFl), Benzo[ghi]perileno (BghiPer), Benzo[k]fluoranteno (BkFl), Criseno (Chr), Fluoreno (F), Fluoranteno (Fl), Indeno[1,2,3-cd]pireno (Ipyr), Naftaleno (NA), Fenantreno (P), Pireno (Pyr), Dibenzo[a,h]antraceno (DBahAnt) y Acenaftileno. Las concentraciones de Acenaftileno y Dibenzo[a,h]antraceno se encontraban por debajo del límite de cuantificación en las determinaciones efectuadas tanto en las *Mossphere*[®] como en las hojas de aligustre, mientras que lo mismo aconteció para el Indeno[1,2,3-cd]pireno en las hojas de aligustre, por lo que no se obtuvieron resultados de estos compuestos en los casos correspondientes. Además, se analizaron Benzo[e]pireno (BePyr) y Reteno (Ret). También se calcularon las sumas de los HAPs de 3, 4, 5 y 6 anillos, así como la suma total (con la excepción de la suma de 6 anillos para las hojas de aligustre al existir un único compuesto determinado con dichos anillos).

Los HAPs se analizaron mediante extracción en matriz de dispersión en fase sólida, seguido de determinación mediante una vaporización de temperatura programada, cromatografía de gases y espectrometría de masas en tandem (PTV-GC-MS / MS) empleando metodología desarrollada por algunos de los miembros de presente equipo de investigación para las *Mossphere*[®] (Concha-Graña *et al.*, 2015) y para hojas de frondosas (De Nicola *et al.*, 2016).

Para la determinación de N total, se pesaron en una balanza de precisión (Mettler Toledo XP26) alícuotas de 3 mg ± 0.1 de material seco, y se empaquetaron en cápsulas de estaño (Eurovector). Posteriormente las cápsulas se analizaron en un analizador elemental de N (FlashEA1112 ThermoFinnigan). Aunque no estaba incluido en el Pliego de Prescripciones Técnicas, se analizó la relación isotópica ($\delta^{15}\text{N}$) para diferenciar la contaminación por Nitrógeno amoniacal o nítrico, que tienen diferentes orígenes. Para ello, el analizador elemental estaba acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica (Deltaplus, ThermoFinnigan). La calibración del gas de referencia (N_2) para el ^{15}N atmosférico se realizó con IAEA-N-1 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), IAEA-N-2 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e IAEA-NO-3 (KNO_3) como estándares. Las relaciones isotópicas ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de las muestras se cotejaron con el estándar

(N₂ atmosférico), de tal forma que las proporciones obtenidas fueran comparables. La abundancia relativa del ¹⁵N en la muestra ($\delta^{15}\text{N}$) se calculó mediante la expresión:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{\textperthousand}) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{est\'andar}}) - 1] \times 10^3, \text{ donde } R \text{ es la relaci\'on } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}.$$

Además, para las *Mossphere®* y para todos los elementos, compuestos y la relación isotópica determinadas, se analizó por quintuplicado material de musgo no expuesto (tiempos 0) y los controles, siguiendo el mismo procedimiento analítico.

Todos los datos analíticos obtenidos se adjuntan en el Anexo I, las figuras derivadas de dichos datos en el Anexo II, y el informe de laboratorio sobre el control de la calidad analítica en el Anexo III.

3.7. Tratamiento de datos y análisis estadísticos

En el caso de las *Mossphere*[®], en primer lugar, se procedió a comprobar si había existido contaminación de las muestras durante el proceso de transporte hasta el laboratorio, comparando las 5 muestras con la concentración inicial y los 5 controles empleados mediante el cálculo de un test de la U de Mann-Whitney (Tabla 4). No se observó contaminación para ningún elemento/compuesto/isótopo (es decir, la probabilidad del test fue mayor a 0,05) excepto para Cu, Hg, Mn, N, Pb y Zn, mientras que para Ni se detectó una pérdida del elemento. En todos estos casos las concentraciones obtenidas se corrigieron por estos valores (se le restó a la concentración obtenida la diferencia entre la media de los controles y la media de los tiempos 0, ver Tabla 4). Posteriormente se aplicó la metodología de Couto *et al.* (2004a, 2004b), en las que se asemejan los tiempos 0 a los blancos, para calcular el límite de cuantificación de la técnica (Tabla 4). Para los metales estudiados, salvo muy contadas excepciones, y en especial en el caso del Sb, las concentraciones de las muestras estuvieron por encima del LOQ de la técnica. Sin embargo, en el caso del N y de los HAPs, la tendencia fue la inversa, diferenciándose en pocas ocasiones los resultados obtenidos al de los tiempos 0, evidenciando la práctica ausencia de enriquecimiento. La tasa de enriquecimiento se calculó como la concentración final menos la concentración inicial (tiempos 0) dividida entre los días de exposición.

Posteriormente, tanto para los datos de las *Mossphere*[®] como de los aligustres, se calcularon las funciones de densidad para cada una de las variables estudiadas mediante suavizado kernel (“kernel smoothing”) usando el paquete KernSmooth (Ripley, 2002) bajo R (R Development Core Team, 2004) (Figuras 90-95). Esto permite estimar el valor de la primera moda de la distribución de cada elemento, que correspondería a la moda de la distribución del subconjunto de datos con las concentraciones más bajas (no contaminadas). Para obtener esta distribución, se emplea dicha moda y se construiría una distribución simétrica generando una imagen espectral de los datos de la izquierda de la moda. Posteriormente se calcula el percentil del 99% de dicho conjunto de datos, que se toma como valor de referencia que para una probabilidad del 1%, en caso de ser superado, indique que una determinada muestra está fuera de la distribución de datos no

contaminados (indicando por tanto que está efectivamente contaminada). Finalmente, para cada variable se calcularon semivariogramas omnidireccionales empleando las funciones del núcleo de R (R Development Core Team, 2004), para comprobar el comportamiento espacial de cada variable sobre el territorio estudiado y, en concreto, si existía una estructura espacial en los datos de las variables. En los semivariogramas se representa en el eje de abscisas la distancia entre los puntos y en el eje de ordenadas la semivarianza. Si los datos tuviesen estructura espacial, esperaríamos que los puntos más cercanos entre sí tuviesen unas concentraciones parecidas (baja semivarianza) y en los más alejados serían más diferentes (alta semivarianza). Por lo tanto, la representación gráfica de la semivarianza frente a la distancia entre los puntos de muestreo permite identificar la existencia de estructura espacial en los resultados obtenidos. En el caso de que así fuera, para representar dicha estructura espacial se aplicaría la técnica de *kriging*, que asume que los puntos próximos en el espacio tienden a tener valores más parecidos que los puntos más distantes, y por tanto los datos de una determinada población se encuentran correlacionados en el espacio.

Por otra parte, se ensayaron correlaciones entre todas las variables analizadas en *Mossphere* por un lado (metales, HAP y variables relacionadas con N), y al igual por otro (metales, HAP, variables de N y variables fisiológicas no destructivas). Así mismo, con todas esas variables se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP) para *Mossphere* y al igual por separado. Para estos análisis se utilizó SPSS 24.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Todos los datos basados en sistemas de información geográfica se trajeron, para su entrega, en formatos compatibles con GVSIG.

3.8. Valoración del aligustre como filtro verde

Como actividad complementaria a las descritas, se valoró la capacidad del aligustre como filtro verde absorbente de contaminantes. Para ello, en los árboles muestreados se midió el índice de área foliar (LAI) utilizando un analizador de dosel vegetal LI-COR LAI-2200C (Figura 17). Esto permitía estimar la cantidad de hojas de cada aligustre muestreado y, en consecuencia, estimar la cantidad total de masa foliar de aligustre en la ciudad de Logroño. Teniendo en cuenta la concentración media de cada contaminante en los aligustres analizados, se estableció la cantidad total de contaminantes retirados de la atmósfera por las hojas de aligustre.

3.9. Autorizaciones

Para todas las labores de selección de puntos de muestreo, colocación y recogida de las esferas, recolección de material de aligustre, etc., se contó con la autorización pertinente del Ayuntamiento de Logroño.

4. Resultados

4.1. Análisis de metales pesados en *Mossphere*®

Se analizaron un total de 9 metales (Tabla 5; Figuras 18-26). La tasa de enriquecimiento media más elevada se encontró en el caso de metales mayoritarios que se encuentran ampliamente distribuidos de manera natural, como Zn y Mn, seguidos de Cu. Los tres son elementos esenciales para los seres vivos, aunque pueden resultar tóxicos en concentraciones excesivas. A continuación se encontraron el resto de elementos, que no tienen funciones biológicas conocidas y sólo actúan como contaminantes, en el siguiente orden: Pb > Ni > V > Sb > Cd > Hg. Esta ordenación recoge, en gran parte, la diferencia de concentración entre los elementos más y menos abundantes en el medio ambiente. Resulta destacable que, en todos los metales, las *Mosspheres* pudieron discriminar estaciones más y menos enriquecidas, lo que avala su capacidad biomonitorizadora de metales pesados.

En el caso del Cd (Figura 18), se encontraron 21 estaciones con tasas altas de enriquecimiento. Estaban situadas en los Polígonos Industriales de La Portalada y Cantabria, así como en localizaciones cercanas a carreteras (estación 6 cerca de la N-111a, estaciones 55 y 66 cerca de la Circunvalación Sur) y aparcamientos (31, 67, 72, 73). Otras estaciones enriquecidas tienen una justificación más difícil, como las estaciones 80 (situada en un entorno agrícola) y 35 (junto al Edificio Científico-Tecnológico de la Universidad de La Rioja). Sería muy interesante seguir la evolución temporal de todas estas estaciones para comprobar estas tendencias. Curiosamente, el casco urbano de la ciudad apenas registra estaciones enriquecidas en Cd.

En el caso del Cu (Figura 19), se encontraron 32 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, con una gran coincidencia con el Cd (Polígonos Industriales de La Portalada y Cantabria, carreteras, aparcamientos) pero con mayor incidencia en el casco urbano, principalmente en el centro y sureste de la ciudad.

En el caso del Hg (Figura 20), se encontraron sólo 13 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, con una cierta coincidencia con el Cd en cuanto a Polígonos Industriales (aunque sólo La Portalada: estación 64), carreteras (estaciones 76-78 en el entorno de la AP-68, estación 74 cerca de la Carretera de Villamediana) y aparcamientos (estación 73 en el Hospital San Pedro). Todas estas estaciones se sitúan en la parte límite hacia el sureste del territorio estudiado. El casco urbano está libre de estaciones enriquecidas en Hg, pero nuevamente se encuentran algunas en la parte norte del territorio, en enclaves cercanos a la carretera de El Cortijo (estaciones 1 y 2), rurales (estación 80), y algunas alineadas casi perfectamente a lo largo del curso del río Ebro y en ambas orillas (estación 17 en el interior de Las Norias, 18, y 20 y 21 junto a la Plaza de Toros y Riojafórum, lugares ambos de aglomeraciones de población en eventos, y con aparcamientos). Nuevamente, el enriquecimiento en Hg es compatible con la influencia de las combustiones derivadas del tráfico, pero también es cierto que otras estaciones presumiblemente influidas por este factor no muestran este enriquecimiento.

En el caso del Mn (Figura 21), se encontraron sólo 10 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, en enclaves muy parecidos a los mencionados para Hg: 21, 64, 72, 73, 77, 78 y 80 (ver las observaciones mencionadas para Hg). Aparecen enriquecidas, como novedad con respecto a Hg, la estación 66 junto a una carretera, y la 65 y la 75 en el Polígono de La Portalada.

En el caso del Ni (Figura 22), se encontraron 34 estaciones con tasas altas de enriquecimiento. Entre ellas vuelven a destacar las situadas en los Polígonos Industriales de La Portalada y, especialmente, Cantabria, y las del entorno de la AP-68 en la parte sureste del territorio. En el extremo suroeste aparecen dos (66 cerca de carretera y 79 junto a la Consejería de Medio Ambiente y el parque de Bomberos), otras dos en la parte centro-sur (57 junto a la vía del tren y 71 cercana a la Circunvalación), y una curiosa alineación de siete estaciones en la parte norte del casco urbano a ambas orillas del Ebro (29-31, 33-34, y 18-19, sólo en un par de casos asociadas a situaciones de “riesgo” como aparcamientos). Más al norte de esta alineación se encuentra otra casi paralela, lo que parece sugerir alguna influencia de Ni en el tercio norte de la ciudad.

En el caso del Pb (Figura 23), se encontraron 25 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, que volvían a repetir casos anteriores: estaciones situadas en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada (es decir, la parte este del territorio estudiado), los extremos noroeste (estaciones 2-4 y 15) y suroeste (estación 66), la estación 73 (aparcamiento del Hospital San Pedro) y algunas estaciones del casco urbano como la 56 (rotonda en el cruce de la calle Chile y la Circunvalación, uno de los puntos que soporta más tráfico en la ciudad), la 44 y 45 en pleno centro de la ciudad (calles Múgica y Jorge Vigón) y la 33 (calle Ateneo Riojano).

En el caso del Sb (Figura 24), se encontraron 19 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, la mayoría en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada. El resto se ubicaban agrupadas en la parte centro-sur a ambos lados de la Circunvalación y en Avenida de Madrid (estaciones 56, 57, 70 y 83), y en dos casos aisladas en las calles Pradoviejo (estación 67, junto a un aparcamiento) y Madre de Dios (estación 34).

En el caso del V (Figura 25), se encontraron 22 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, la mitad de las cuales, nuevamente, en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada. El resto se ubicaban en la parte sur y suroeste del territorio (casi todas se han citado anteriormente y estaban cerca de carreteras o aparcamientos: 40-41, 56, 66-68, 70, 72, 73 y 79; curiosamente, la 41 estaba situada en el pequeño Polígono Industrial de la calle General Yagüe, cerca de un concesionario de automóviles) salvo la 80, en el extremo noroeste (que también se ha mencionado en varios casos anteriores).

Finalmente, en el caso del Zn (Figura 26), se encontraron 13 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, 11 de ellas en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada. Las dos restantes se encontraban en la Plaza de las Chiribitas (46) y la rotonda en el cruce de la calle Chile y la Circunvalación (56).

En resumen, las estaciones situadas en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada mostraban tasas altas de enriquecimiento en todos los elementos analizados. Otras estaciones ubicadas cerca de carreteras (preferiblemente vías grandes como la Circunvalación Sur) y aparcamientos también estaban enriquecidas en diversos elementos, mientras que el casco urbano mostraba en general bajas tasas de enriquecimiento. Estos

resultados parecen tener relación, al menos, con la densidad de tráfico en las distintas zonas de Logroño y su área metropolitana, cuya influencia se puede inferir del Mapa de Ruidos de Logroño (Figura 27).

Es importante destacar que no existen aún datos comparativos de la aplicación de esta técnica, en las mismas condiciones utilizadas en el presente estudio, en otras ciudades, lo que permitiría poner nuestros datos en un contexto más amplio y evaluar la contaminación que soporta Logroño y su área metropolitana en relación con otros lugares. En efecto, esta comparación sólo resulta aconsejable cuando se utiliza la misma especie como biomonitor, la misma duración del periodo de exposición, la misma época del año, etc. (Capozzi *et al.*, 2016a, 2016b). No obstante, sí que se puede inferir, a partir de los resultados obtenidos, que las concentraciones obtenidas son relativamente bajas en un amplio contexto de técnicas de biomonitorización empleadas en las últimas décadas. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que el territorio estudiado carece de fuentes de contaminación severa, aunque sería conveniente seguir de cerca la evolución de la calidad del aire en los lugares donde se han encontrado repetidamente altas tasas de enriquecimiento, especialmente en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada.

4.2. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en *Mossphere*®

En las Figuras 28-48 se representan las tasas diarias de enriquecimiento de los 16 HAP medidos (Acenafreno (Ace), Antraceno (Ant), Benzo[a]antraceno (BaAnt), Benzo[a]pireno (BaPyr), Benzo[b+j]fluoranteno (BbjFl), Benzo[e]pireno (BePyr), Benzo[ghi]perileno (BghiPer), Benzo[k]fluoranteno (BkFl), Criseno (Chr), Fluoreno (F), Fluoranteno (Fl), Indeno[1,2,3-cd]pireno (Ipyr), Naftaleno (NA), Fenantreno (P), Pireno (Pyr) y Reteno (Ret)), así como las sumas de los HAP de 3, 4, 5 y 6 anillos, y la suma total. Los datos están recogidos en la Tabla 6.

Los HAP más acumulados fueron los de tres anillos, seguidos por los de cuatro anillos (con tasas diarias medias de enriquecimiento aproximadamente la mitad de los de tres anillos), y los de cinco y seis anillos (con tasas de aproximadamente la cuarta parte de los de tres anillos). Esto concuerda con el hecho de que los musgos acumulan más HAP de bajo peso molecular que de alto peso molecular (Huang *et al.*, 2018).

Cada HAP individual seguía un patrón de distribución espacial particular y era difícil encontrar patrones comunes a varios compuestos. En el caso de la suma total de HAP (Figura 48), se encontraron 24 estaciones con tasas altas de enriquecimiento y, como ocurría en el caso de los metales pesados, un buen número de ellas (11) se encontraron agrupadas en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada. Además, había estaciones enriquecidas en el sur del territorio (estaciones 56, 66, 68, 69, 71 y 72, algunas de las cuales ya se han mencionado para metales pesados y se encontraban cerca de carreteras o aparcamientos), el centro del casco urbano (estaciones 44 y 45, también mencionadas en el caso de algún metal pesado), el centro-este (estaciones 47 y 48, esta última cerca de la Circunvalación Este y un centro comercial) y la periferia norte (estación 20) y oeste (estaciones 15 y 40).

En el caso de la suma de HAP con tres anillos (Figura 44), se encontraron 33 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, distribuidas especialmente por los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada, así como por la zona central (estaciones 40-48)

y sur (estaciones 53-56, 59, 66, 68-69 y 71-72) del territorio. Sólo dos estaciones estaban enriquecidas en la zona norte (15 y 17).

En el caso de la suma de HAP con cuatro anillos (Figura 45), se encontraron hasta 43 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, distribuidas por los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada, el casco urbano y las zonas sur y oeste del territorio.

Sin embargo, en el caso de la suma de HAP con cinco anillos (Figura 46), se encontraron sólo 15 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, casi la mitad de ellas en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada. El resto se encontraban en la zona centro-este de la ciudad y el extremo oeste.

Por su parte, en el caso de la suma de HAP con seis anillos (Figura 47), se encontraron 23 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, pero con una distribución claramente distinta de los casos anteriores, ya que, aparte de las estaciones de los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada, sólo se encontraron enriquecimientos en la parte noroeste (siete estaciones) y suroeste (dos estaciones).

En el caso del BaPyr (Figura 41), que la legislación vigente toma como el HAP de referencia, se encontraron tan sólo 11 estaciones con tasas altas de enriquecimiento, menos de la mitad que en el caso de la suma total de HAP (24). No obstante, todas las estaciones enriquecidas en BaPyr estaban también enriquecidas en la suma total de HAP: seis en el Polígono Industrial de La Portalada (las mismas en ambos casos), una en el Polígono de Cantabria (frente a cinco en la suma total de HAP), y cuatro más o menos aisladas en el extremo suroeste, el sureste y el centro-este del territorio (estaciones 40, 47, 66 y 71). Por lo tanto, la diferente distribución espacial del BaPyr y la suma total de HAP, salvo en la zona del Polígono de la Portalada, sugiere que el BaPyr no es representativo del total de HAP, como parece asumir la legislación vigente. Por lo tanto, se deberían medir más HAP para tener una imagen más fidedigna de la realidad.

En resumen, y como ocurría con los metales pesados, hay que destacar que no existen aún datos comparativos de biomonitorización de HAP con *Mossphere*® en otras ciudades, por lo que no se puede evaluar la calidad del aire de Logroño y su área metropolitana en relación con otros lugares, aunque las tasas de enriquecimiento obtenidas apuntan a que la

contaminación es pequeña. Sí que se puede zonificar el territorio estudiado en áreas más y menos enriquecidas de contaminantes, y entre las primeras destacan, como en el caso de los metales pesados, los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada.

4.3. Análisis de Nitrógeno y $\delta^{15}\text{N}$ en *Mossphere*[®]

En todas las estaciones se registró una pérdida neta de N (Tabla 7; Figura 49), posiblemente porque el musgo desvitalizado se limita a intercambiar con la atmósfera formas amoniacales, que actúan como cationes como en el caso de los metales, pero pierde N posiblemente por el progresivo deterioro de las membranas celulares. Por lo tanto, no hubo ninguna estación enriquecida en N, y se puede concluir que este biomonitor tiene una escasa capacidad de biomonitorización global de este elemento y no cabe compararlo con biomonitores vivos en este caso.

Por su parte, la relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$ (Tabla 7; Figura 50) mostró tasas altas de enriquecimiento en nueve estaciones, indicando un incremento de formas oxidadas de N (posiblemente derivadas de formas particuladas), al tiempo que se registran pérdidas netas de este elemento.

4.4. Correlaciones entre las variables obtenidas en *Mossphere*® y análisis multivariante

En general hay bastantes correlaciones entre las variables analizadas en las *Mossphere*®, tanto en los metales como en los HAP (Tabla 8). Los metales que mostraron más correlaciones fueron Ni, Zn, Cd y Mn, mientras que Cu, Pb y V solo se correlacionaron con dos metales. En todos los casos las correlaciones son positivas. En cuanto a los HAP, en general todos se correlacionaban positivamente entre sí, con la excepción de la suma de los HAP de 3 anillos y 6 anillos, que no estaban correlacionadas. También se observaron correlaciones positivas entre los distintos HAP y los metales, con la excepción de los HAP de 3 anillos, que no se correlacionaban con ningún metal. Especialmente significativa era la correlación entre Cd y Sb con los HAP. Por su parte, el N mostraba correlaciones negativas con la mayoría de metales y HAP, dado que se registraron pérdidas netas de N en el musgo, mientras que la relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$ no se correlacionaba con ninguna otra variable, ni siquiera con el N.

Esta red de correlaciones quedaba plasmada en el ACP realizado con los datos de las *Mossphere*® (Figura 51), que sintetiza los resultados obtenidos. La varianza recogida por los tres primeros ejes fue del 50% y la figura del ACP se realizó con los dos primeros ejes. El eje 1 (horizontal) representa un gradiente de contaminación, de mayor nivel hacia la parte positiva. Esta contaminación está representada, como factores de carga, por prácticamente todos los contaminantes analizados, que se correlacionaban notablemente entre sí (Tabla 8), pero como factores de carga principales destacaban las tasas de enriquecimiento en el total de HAP, la suma de HAP de tres y cuatro anillos, y varios metales (Mn, Ni, V, Sb y Cd). Hacia la parte más positiva del eje 1 se encontraban las estaciones presumiblemente más contaminadas. Entre ellas destacaban, como se ha reiterado anteriormente, las localizadas en los Polígonos Industriales de Cantabria (estaciones 9, 11, 22, 23, 24, 26, 37) y La Portalada (estaciones 63, 64, 65, 75, 76), situados en la parte este del territorio estudiado. Junto a estas estaciones también se agrupaban tres influidas claramente por el tráfico de la Circunvalación Sur (71, 72 y, sobre todo, 56: la rotonda de la calle Chile con la Circunvalación), y la situada junto al CARPA (47), donde aparcan muchos ciudadanos que acuden a este Centro. Curiosamente, las dos estaciones con mayores enriquecimientos eran periféricas, una de ellas cercana a graveras del suroeste

con gran incidencia de tráfico pesado (66) y otra en un viñedo de la parte este del territorio (77). Esta última podría estar influida tanto por el tráfico de la AP-68 y la Circunvalación como por los vientos dominantes del oeste, que podrían transportar también contaminantes del cercano Polígono de La Portalada. Además, la estación 77 estaba cercana a otra estación enriquecida (78), probablemente influida por los mismos factores. Finalmente, otras estaciones situadas hacia la parte positiva del eje 1, pero más cerca del eje 2 y por lo tanto con menor acumulación de contaminantes, eran la 15 (vial entre la ermita del Cristo y Valdegastea), 18 (Avenida de la Playa junto a Cabo Noval), 21 (junto al aparcamiento de Riojafórum), 40 (calle Valdegastea) y 67 (calle Prado Viejo junto a un centro comercial). La mayoría de las estaciones, mucho menos enriquecidas en contaminantes y de niveles parecidos, se agrupaban hacia la parte negativa del eje 1. Como estaciones menos enriquecidas se pueden destacar las situadas en espacios abiertos de la parte oeste o noroeste de la ciudad, como El Cubo, Las Norias, El Campillo o el entorno del Parque de los Enamorados.

El ACP descrito también se relacionaba con el número de contaminantes que enriquecían cada una de las *Mosspheres* (Figura 52). Las estaciones enriquecidas en entre 10 y 24 contaminantes se correspondían bien con las más enriquecidas en el ACP, aunque aparecían otras nuevas dentro del casco urbano o más periféricas: 10 (Circunvalación junto al Polígono de Cantabria), 20 (Parque del Ebro junto a la Plaza de Toros), 34 (Madre de Dios junto al cruce con Padre Marín), 44 (Pérez Galdós con Mágica) y 48 (final de la calle Cigüeña junto a la Circunvalación. Curiosamente, todas las estaciones estudiadas estaban enriquecidas en al menos un contaminante.

En conclusión, tanto el ACP como el análisis del número de contaminantes en los que está enriquecida cada estación son métodos válidos para detectar un gradiente de enriquecimiento de contaminantes en el territorio estudiado, y una combinación de ambos permite revelar un amplio abanico de estaciones enriquecidas.

4.5. Análisis de metales pesados en aligustre

Se analizaron un total de 12 metales (Tabla 9; Figuras 53-64). Como en el caso de las tasas de enriquecimiento de las *Mossphere*®, las concentraciones medias más elevadas en las hojas de aligustre se hallaron en metales esenciales y mayoritarios que se encuentran ampliamente distribuidos de manera natural, pero en distinto orden: Mn > Zn > Cu. A continuación se encontraron el resto de elementos, que no tienen funciones biológicas conocidas y sólo actúan como contaminantes, con pequeños cambios en el orden: Ni > Pb > V > Pd > As > Sb > Cd > Hg > Rh. En todos los metales, las hojas de aligustre pudieron discriminar estaciones más y menos enriquecidas.

En el caso del As (Figura 53), se encontraron únicamente 3 árboles enriquecidos, concretamente los números 6 (calle Ebro), 14 (calle Tejada) y 16 (calle Víctor Pradera, cerca de la salida de un aparcamiento subterráneo). No parece haber relación entre estas localizaciones.

En el caso del Cd (Figura 54), se encontraron 12 árboles enriquecidos, tanto dentro del casco urbano (14 en calle Tejada, 16 en calle Víctor Pradera, 18 en calle Villegas, 25 en calle Pérez Galdós) como en lugares más periféricos (6 en calle Ebro, 9 junto a Riojafórum, 10 en una rotonda de la calle Luis de Ulloa, 20 también en Luis de Ulloa, 36 en calle Najarilla, 41 en calle Tejeras junto a un centro comercial, 48 en la Senda de los Pedregales en una localización semi-rural, y 49 en calle Manantiales en el barrio de La Estrella).

En el caso del Cu (Figura 55), se encontró un solo árbol enriquecido, el número 16 en calle Víctor Pradera.

En el caso del Hg (Figura 56), se encontraron 13 árboles enriquecidos, generalmente en zonas periféricas de la ciudad, agrupados en la zona oeste (números 14 en calle Tejada, 22 en calle General Yagüe cerca de una gasolinera y un concesionario de automóviles, 23 en Avenida de Burgos junto a la vía del tren, y 31-33 en Avenida de Burgos a la salida de la ciudad y en los parques de San Miguel y Manuel de Falla, este último cerca de un concesionario de automóviles) y este (18-20 desde calle Villegas hasta San José de

Calasanz, 39 en calle Garcilaso cerca de la estación de tren, 40 en el vial que conecta Los Lirios con La Estrella, y 48 en la Senda de los Pedregales).

En el caso del Mn (Figura 57), se encontraron 22 árboles enriquecidos, repartidos sobre todo por zonas periféricas de la ciudad hacia el oeste, sur y este, con alguna localización también dentro del casco urbano.

En el caso del Ni (Figura 58), se encontraron sólo 5 árboles enriquecidos, tres de ellos dentro del casco urbano (18 en calle Villegas, 25 en calle Pérez Galdós y 38 en calle Villamediana) y dos en la periferia (35 al final de República Argentina y 47 en calle Ortega y Gasset junto a la Circunvalación).

En el caso del Pb (Figura 59), se encontraron sólo 5 árboles enriquecidos, dos en la zona oeste (14 en calle Tejada y 23 en Avenida de Burgos junto a la vía del tren), uno en la zona norte (6 en calle Ebro) uno en el centro-este (17 en Duquesa de la Victoria junto a la Glorieta) y otro en el este (19 en San José de Calasanz).

En el caso del Pd (Figura 60), se encontraron 7 árboles enriquecidos, todos ellos en zonas periféricas del norte (6 en calle Ebro y 9 en Riojafórum), oeste (2 y 11 en Valdegastea, 32 en Manuel de Falla y 42 junto al aparcamiento de un centro comercial), y sur (46 en la esquina de Diego Velázquez con Clavijo).

En el caso del Rh (Figura 61), se encontraron sólo 6 árboles enriquecidos, nuevamente en zonas periféricas del oeste (2, 11, 32 y 42), nordeste (9) y sur (46), todos ellos coincidentes con el Pd.

En el caso del Sb (Figura 62), se encontraron 23 árboles enriquecidos, distribuidos por casi todo el casco urbano (números 8, 10, 14, 15, 17-20, 23-26, 28, 29), así como la parte periférica del territorio hacia el este (30, 40, 50) y algunas zonas aisladas del norte (6) y el sur (35, 39, 43 y 47), dejando amplias zonas no enriquecidas en la zona periférica de la ciudad hacia el oeste (salvo el número 31 en Avenida de Burgos a la salida de la ciudad).

En el caso del V (Figura 63) no se encontró ningún árbol enriquecido.

Finalmente, en el caso del Zn (Figura 64), se encontraron 11 árboles enriquecidos, principalmente en las zonas oeste (2 en Valdegastea, 22 en calle General Yagüe cerca de una gasolinera y un concesionario de automóviles, 23 en Avenida de Burgos junto a la vía del tren, 32 en Manuel de Falla, y 41 y 42 en calle Tejeras junto a un centro comercial) y nordeste (6-9 de la calle Ebro al Riojafórum y 20 en Luis de Ulloa).

No existen datos comparativos de biomonitorización de metales pesados con hojas de aligustre en la bibliografía. Por lo tanto, no se pueden colocar nuestros datos en un contexto geográfico más amplio. Sí se ha comprobado la utilidad de esta especie como biomonitor de metales pesados, aunque los resultados son quizá menos sólidos que en el caso de las *Mossphere*® porque la distribución de los aligustres no incluía las zonas más enriquecidas en contaminantes detectadas con las *Mossphere*® (los polígonos industriales de Cantabria y La Portalada). Se han encontrado entre 0 (V) y 23 (Sb) árboles enriquecidos en los distintos metales analizados. En general, los árboles enriquecidos estaban situados más frecuentemente en zonas periféricas de la ciudad que en zonas interiores, y había ejemplares enriquecidos en varios elementos a la vez, como los números 6, 9, 14 y 18 en la zona norte, 20 en la zona este y 23 y 32 en la zona oeste.

4.6. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en aligustre

En las Figuras 65-83 se representan las concentraciones de los 15 HAP medidos en hojas de aligustre (Acenafreno (Ace), Antraceno (Ant), Benzo[a]antraceno (BaAnt), Benzo[a]pireno (BaPyr), Benzo[b+j]fluoranteno (BbjFl), Benzo[e]pireno (BePyr), Benzo[ghi]perileno (BghiPer), Benzo[k]fluoranteno (BkFl), Criseno (Chr), Fluoreno (F), Fluoranteno (Fl), Naftaleno (NA), Fenantreno (P), Pireno (Pyr) y Reteno (Ret)), así como las sumas de los HAP de 3, 4 y 5 anillos, y la suma total. Los datos están recogidos en la Tabla 10. En general, las concentraciones halladas en nuestro estudio en aligustre son más bajas que las encontradas en otras especies (pino, roble) en otros países (Huang *et al.*, 2018), aunque estas comparaciones hay que efectuarlas con gran cautela por las diferentes características de los estudios en cuanto a especie, periodo de exposición, condiciones meteorológicas, etc.

Como en el caso de las *Mossphere*®, los HAP más acumulados fueron los de tres anillos, seguidos por los de cuatro anillos (con concentraciones aproximadamente la mitad de los de tres anillos), y los de cinco y seis anillos (con concentraciones aproximadamente la cuarta parte de los de tres anillos).

Como ocurría también en las *Mossphere*®, cada HAP individual seguía un patrón de distribución espacial particular y no aparecían patrones comunes a varios compuestos. Por ejemplo, se encontraron HAP no enriquecidos en ningún árbol y otros enriquecidos hasta en 27 árboles. En el caso de la suma total de HAP (Figura 83), se encontraron 14 árboles enriquecidos, localizados principalmente en el casco urbano (números 15, 16, 25, 26, 27, 28), así como en el noroeste (4 y 13), el sur (46) y el este (8, 9, 29, 49 y 50). En la mayor parte de los casos se trataba de árboles no enriquecidos en metales pesados.

En el caso de la suma de HAP con tres anillos (Figura 80), se encontraron 15 árboles enriquecidos, distribuidos especialmente en la mitad sur del casco urbano y en la periferia sur. Para la suma de HAP con cuatro anillos (Figura 81), se encontraron 18 árboles enriquecidos, localizados en el casco urbano y la zona periférica. En el caso de la suma

de HAP con cinco anillos (Figura 82), se encontraron sólo 5 árboles enriquecidos, distribuidos por la zona norte.

El BaPyr (Figura 78), que la legislación vigente toma como el HAP de referencia, mostró sólo 2 árboles enriquecidos frente a los 14 de la suma total de HAP. Aunque todos los árboles enriquecidos en BaPyr estaban también enriquecidos en la suma total de HAP, el BaPyr no parece especialmente representativo del total de HAP. Por lo tanto, se debería analizar una mayor diversidad de HAP para estar más cerca de la realidad.

En resumen, y como ocurría con los metales pesados, hay que destacar que no existen aún datos comparativos de biomonitorización de HAP con hojas de aligustre en otras ciudades, por lo que no se puede evaluar la calidad del aire de Logroño y su área metropolitana en relación con otros lugares, aunque las concentraciones obtenidas apuntan a que la contaminación es pequeña.

4.7. Análisis de Nitrógeno y $\delta^{15}\text{N}$ en aligustre

No se encontró ningún árbol enriquecido en N (Tabla 11; Figura 84), probablemente porque la deposición de N en Logroño fue escasa y además, al tratarse de un elemento esencial para la planta, estaba sujeto a cierto control metabólico. Por lo tanto, las hojas de aligustre no parecen adecuadas para la biomonitorización de N.

Por su parte, la relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$ (Tabla 11; Figura 85) mostró valores positivos en la gran mayoría de los casos, indicando una deposición fundamentalmente de formas oxidadas de N.

4.8. Medidas fisiológicas no destructivas en aligustre

Estas medidas permitían evaluar los daños producidos en las hojas por la exposición a las condiciones ambientales y, presumiblemente, a los contaminantes. Se midieron tres variables fisiológicas no destructivas: rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m) y contenido en clorofilas y flavonoides. Específicamente, F_v/F_m es una variable que estima la fotosíntesis de la hoja, que a su vez es indicativa de su vitalidad, es decir, cuanto mayor sea F_v/F_m , la planta estará en mejor estado fisiológico y se mostrará menos afectada por la contaminación o cualquier otro factor adverso. Por el contrario, una disminución de F_v/F_m indicará un descenso de vitalidad de la planta, que podrá deberse a la contaminación u otros factores. En este sentido, F_v/F_m es un indicador de vitalidad que nos informa sobre el estado fisiológico de la planta, pero de manera inespecífica porque su variación depende no sólo de la contaminación sino de otros factores potencialmente adversos, como el exceso de luz, el frío, el calor, la sequía, el exceso de agua, las deficiencias nutricionales, etc. El contenido de clorofilas también se relaciona con la capacidad que tiene la hoja de hacer fotosíntesis, y por lo tanto con su vitalidad fisiológica, y se interpreta de la misma manera que F_v/F_m : cuanto más alto es el contenido de clorofilas, la vitalidad fisiológica es mayor, y un descenso de esta variable indica la influencia negativa de algún factor adverso. Finalmente, el contenido en flavonoides indica en general la respuesta de la planta a diversos factores adversos. En efecto, los flavonoides son un tipo de compuestos, muchos con función antioxidante, que la planta utiliza como respuesta o para protegerse del exceso de luz, los daños oxidativos, los herbívoros que pueden alimentarse de ella, las deficiencias nutricionales, las heridas, etc. Por lo tanto, un mayor contenido de flavonoides indica, en general, que la planta está respondiendo a algún factor ambiental adverso para evitar, en lo posible, los daños fisiológicos provocados por dicho factor. Por el contrario, un menor contenido de flavonoides indica que la planta está en equilibrio con el medio en que se encuentra, sin que esté siendo afectada por factores adversos contra los cuales deba desarrollar mecanismos de defensa. Se puede encontrar más información al respecto en Johnstone *et al.* (2013).

Los resultados correspondientes a las medidas no destructivas (rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, F_v/F_m , y contenido en clorofilas y flavonoides) se muestran en

las Figuras 86-88 y los datos se recogen en la Tabla 12. Los valores de F_v/F_m (Figura 86) oscilaron entre 0.69 y 0.83, con sólo 10 árboles por debajo de 0.78. Dado que los valores entre 0.78 y 0.85 corresponden a plantas con gran vitalidad fisiológica, no afectadas de manera importante por factores adversos como la contaminación (Johnstone *et al.*, 2013), se puede concluir que la gran mayoría de los árboles (un 80%) muestran valores óptimos. En el caso del 20% que presentan valores relativamente bajos, esto puede estar causado por diversos factores internos y ambientales, y no necesariamente por la contaminación. De hecho, la localización preferente de estos árboles es la periferia de la ciudad, y por lo tanto es previsible que soporten menos contaminación. No obstante, algunos de estos árboles se encuentran en zonas cercanas a tráfico de vehículos o trenes (30, 32, 34, 48), y se encontraron correlaciones negativas significativas (al menos $p < 0.05$) de F_v/F_m con las concentraciones de algunos contaminantes (As, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, V, PAH de tres y cuatro anillos y N), así como con la relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$. Hay que tener en cuenta que algunos de estos contaminantes (N, Cu y Mn) son a la vez elementos esenciales para las plantas, por lo que su correlación negativa con F_v/F_m sugeriría que habrían superado los umbrales de toxicidad en la planta. En conjunto, y aunque es conocido que F_v/F_m responde a numerosos factores ambientales, las hojas de aligustre parecían reducir su eficiencia fotosintética tras absorber un exceso de algunos contaminantes, aunque esta reducción no comprometía su fisiología porque seguían conservando valores relativamente altos. Por lo tanto, F_v/F_m puede ser una variable indicadora de efectos fisiológicos negativos debidos a la contaminación, y se recomienda continuar estudiando esta variable en futuros estudios de biomonitorización de calidad del aire en ambientes urbanos mediante árboles ornamentales y, en concreto, aligustre.

Los contenidos de clorofilas oscilaron entre 24.5 y 45.9 (Figura 87). No se encontró ningún árbol con indicio de daños. Los valores más altos los presentaron los aligustres situados en el centro de la ciudad y en localizaciones sombreadas, de acuerdo con la respuesta de esta variable en plantas sanas. Se encontraron correlaciones positivas significativas (al menos $p < 0.05$) del contenido de clorofilas con las concentraciones de algunos metales pesados (Mn, Pb, Sb y V) y N, pero estas correlaciones tienen un dudoso significado fisiológico (salvo la correlación con N, que parece lógica desde el punto de vista fisiológico dado que el N es un constituyente de la clorofila). En conclusión, el contenido de clorofila no

discriminaba árboles en distintos estados fisiológicos y la utilidad de esta variable en biomonitorización de calidad del aire parece dudosa.

La variable fisiológica que más variabilidad presentó fueron los flavonoides, con valores que oscilaron entre 0.62 y 1.92 (Figura 88). Esta variabilidad era esperable, ya las concentraciones de flavonoides en las plantas dependen de muchos factores ambientales, tales como la radiación, el estado hídrico, la nutrición mineral, la contaminación, etc. Se observó una cierta distribución espacial, con los valores más bajos en el centro de la ciudad, posiblemente debido en parte a una menor exposición a la radiación por el sombreo de los edificios. Sólo tres árboles mostraban valores relativamente más altos de flavonoides y, por su localización, no pareció que estos valores se relacionasen con procesos de contaminación. El contenido de flavonoides presentó correlaciones positivas significativas (al menos $p < 0.05$) con algunos metales pesados (As, Cu, Mn y Ni) y N, lo que sugeriría que la planta adopta mecanismos de defensa frente a estos contaminantes incrementando su contenido de flavonoides. Se necesitan más investigaciones para confirmar esta hipótesis.

4.9. Correlaciones entre las variables obtenidas en aligustre y análisis multivariante

Los contaminantes analizados en las hojas de aligustre estaban menos correlacionados que en el caso de las *Mosspheres* (Tabla 13). Los metales mostraban pocas correlaciones entre sí. Por ejemplo, el Pd no se correlacionaba con ningún otro metal, y el Mn y el Rh sólo con uno. Por el contrario, el Pb es el metal que se correlacionaba en mayor medida con el resto. Sin embargo, los HAP mostraban correlaciones más fuertes entre sí, con la excepción de los que tienen tres anillos, que sólo se correlacionaban con los totales. En todos los casos las correlaciones eran positivas.

Al contrario que en las *Mosspheres*, no existían correlaciones de los HAP totales con ningún metal. Los distintos grupos de HAP de cuatro y cinco anillos se correlacionaban exclusivamente con As y Cu. El N y la relación isotópica $\delta^{15}\text{N}$ en los aligustres sí que mostraban correlaciones positivas con los HAP totales y con algunos metales.

Estas correlaciones estaban resumidas en el ACP realizado para el aligustre (Figura 89). La varianza recogida por los tres primeros ejes fue del 50%. Los factores de carga más significativos fueron los relacionados con la parte positiva del eje 1 (concentraciones de Ni, As, Pb, HAP totales y HAP con cuatro anillos) y con la parte positiva del eje 2 (concentraciones de Hg, V, Sb y Pb). Esto significaba que, en el aligustre, la concentración de HAP se relacionaba con la de algunos metales (como As y Ni), originando una contaminación de tipo mixto, mientras que los metales no relacionados con los HAP (como Hg, V o Sb) originarían otro tipo de contaminación más específica por metales pesados. La distribución de los árboles en el gráfico de ACP confeccionado con los dos primeros ejes mostró una figura más o menos circular, es decir, que los árboles se integraban en un solo grupo grande, sin que ningún árbol se separase claramente del resto. Esto probablemente ocurría porque el gradiente de contaminación que se biomonitorizó con aligustre era menor que el de las *Mosspheres*, ya que no se incluyeron los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada, que han resultado ser, de acuerdo con los resultados de las *Mosspheres*, las zonas más enriquecidas en contaminantes de todo el territorio estudiado. No obstante, la peculiar distribución de los factores de carga del ACP de aligustres mostraba que los árboles situados en el primer cuadrante del ACP, en particular los que presentaban valores

muy positivos tanto del eje 1 como del 2, eran los más enriquecidos en contaminantes, aunque a veces de distinta naturaleza (tanto HAP como metales pesados). Estos árboles eran, principalmente, los números 6 (calle Ebro), 14 (calle Tejada), 15 (Plaza Alférez Provisional), 16 (calle Víctor Pradera), 17 (Duquesa de la Victoria junto a la Glorieta), 18 (calle Villegas), 19 (calle San José de Calasanz), 20 (Luis de Ulloa), 23 (Avenida de Burgos junto a la vía del tren), 25 (calle Pérez Galdós), 28 (Jorge Vigón), 31 (Avenida de Burgos a la salida de la ciudad), 35 (final de República Argentina), 47 (Ortega y Gasset junto a la Circunvalación) y 50 (calle Plantío cerca de la Circunvalación). La mayor parte de estas localizaciones están influidas por tráfico intenso, como se deduce del mapa de ruidos de Logroño (Figura 27), y su distribución se aproxima (aunque es más reducida) a la de los árboles enriquecidos en Sb (Figura 62): casi todo el casco urbano, principalmente la parte norte desde el eje Santa Justa – Pérez Galdós – Pío XII – Lobete hacia el norte hasta el Parque del Ebro, más algunos árboles aislados en la parte periférica del sur (35, 47), sureste (50) y oeste (31). De esta forma, quedaría una amplia zona hacia el oeste y suoreste sin árboles enriquecidos en contaminantes: Valdegastea, Parque de los Enamorados, Yagüe, El Cubo, Parque de San Miguel, La Cava, Fardachón, Las Gaunas y La Guindalera. Otra zona poco enriquecida es la periferia norte (El Campillo). El gradiente de enriquecimiento en contaminantes que se ha descrito para los aligustres estaba probablemente influido por otros factores además de la propia contaminación, como por ejemplo:

- La circulación de vientos en el territorio estudiado. En efecto, la circulación dominante es del Oeste, lo que puede contribuir a que los biomonitores localizados en la zona Oeste acumulen menos contaminantes porque los vientos que entran frecuentemente en la ciudad con gran potencia desde esa dirección hagan disminuir la concentración de contaminantes en el aire.
- La edad de los árboles. Los árboles menos enriquecidos corresponden a ejemplares más jóvenes plantados en barrios de construcción relativamente reciente, como El Campillo, Valdegastea, El Cubo, La Cava, Fardachón o La Guindalera. Estos ejemplares contrastan notablemente con los árboles añosos presentes en calles más antiguas, como Pérez Galdós, Jorge Vigón o Duquesa de la Victoria. Es posible que la acumulación de contaminantes sea mayor en los ejemplares añosos que en los jóvenes, pero esta hipótesis está todavía por demostrar.

4.10. Análisis de estructura espacial en las variables analizadas (semivariogramas)

En ninguno de los semivariogramas obtenidos para los distintos contaminantes en los dos biomonitores se detectó la existencia de estructura espacial. La Figura 96 muestra, como ejemplo y para evitar repeticiones innecesarias, cuatro casos seleccionados entre todos los analizados, correspondientes a variables tanto de las *Mosspheres*® como de los aligustres. En los casos del Benzo(a)antraceno en *Mosspheres*® y Ni y Píreno en aligustres, no existía ninguna relación o tendencia significativa entre la distancia entre los puntos (representada en el eje de abscisas) y la semivarianza (en el eje de ordenadas), sino que se observaban simplemente oscilaciones en torno a la semivarianza media. Si los datos hubiesen tenido estructura espacial, los puntos más cercanos entre sí tendrían concentraciones más parecidas (baja semivarianza) que los más alejados (alta semivarianza). Para saber si los datos eran significativos, se comprobó si el valor de la semivarianza a cada una de las distancias se salía de la envolvente marcada por las líneas correspondientes al 2.5% y 97.5% de la semivarianza. Sólo en el caso del Cd parecía haber un atisbo de estructura espacial, pero muy débil ya que se registran oscilaciones en torno a la semivarianza media y el primer punto está muy próximo a la línea del 2.5%. Dado que los datos no mostraban estructuras espaciales significativas, no se han incluido mapas de *kriging*. Por lo tanto, se puede concluir que ninguna variable mostró una estructura espacial clara, lo que sugiere que el origen de la contaminación es difuso.

4.11. Medidas de Índice de Área Foliar (LAI) en aligustre y valoración como filtro verde

El tamaño de los aligustres estudiados fue muy variable, encontrándose desde árboles pequeños, que ocupaban una superficie de suelo de 0.60 m^2 y un volumen de 0.76 m^3 , hasta árboles grandes que cubrían 1.80 m^2 de superficie y ocupaban un volumen de 3 m^3 . En algunos casos estos árboles grandes se juntaban formando “setos” (Figura 97). El índice de área foliar medido en mayo de 2018 osciló entre 2.25 y 5.60, aunque previsiblemente podría haber aumentado hasta el final del periodo vegetativo anual, por lo que los valores mencionados podrían estar algo infravalorados. El valor medio del LAI de los 50 árboles analizados fue de 3.60. El índice de esclerofilia medido para poder calcular el peso seco de hojas del conjunto de aligustres de la ciudad fue de 1.5 kg m^{-2} . Teniendo en cuenta todas estas medidas se infiere que la biomasa total de hojas de los 2957 árboles de aligustres de Logroño a finales del mes de mayo era alrededor de 20 toneladas. Considerando las concentraciones de contaminantes que se midieron en las hojas de aligustre, la cantidad de contaminantes acumulada por éstas (y por tanto retirada del medio ambiente) a finales de mayo equivaldría a 345 kg de N, 3.1 kg del conjunto de metales pesados analizados, y 4.1 g de HAP. En el caso de los HAP, y teniendo en cuenta que la concentración de HAP en un aire medio de una aglomeración urbana libre de contaminación específica es de 40 ng m^{-3} , los aligustres habrían retirado los HAP contenidos en el aire que llenaría 60 embalses de La Grajera una vez vaciados de agua.

Las cantidades de contaminantes retirados que se han mencionado anteriormente estarían infravalorando la capacidad total que tienen los aligustres de retirar contaminantes, ya que los árboles siguen creciendo hasta el final de su temporada vegetativa y, por tanto, siguen absorbiendo contaminantes. En consecuencia, al realizar la poda al final del año, la cantidad de contaminantes retirados por los árboles habría sido notablemente mayor. Este es uno de los servicios ecosistémicos más importantes que realizan los árboles ornamentales en las ciudades. En este sentido, sería muy interesante conocer la capacidad que tienen las distintas especies ornamentales de Logroño para actuar como filtro verde, de cara a utilizar este criterio en la selección de especies que se pueden utilizar en los parques y jardines de la ciudad.

4.12. Comparación entre los dos biomonitores utilizados: *Mossphere®* vs. aligustre

Se puede deducir de nuestros resultados, confirmando los de Jiang *et al.* (2018), que las *Mossphere®* son mejores biomonitores que las hojas de aligustre por las siguientes razones:

- Las *Mossphere®* son biomonitores activos cuya concentración inicial de contaminantes es conocida. Además, el material vegetal está desvitalizado, por lo que los procesos fisiológicos no interfieren con la acumulación de contaminantes. Así mismo, la estructura del musgo componente es más sencilla que la estructura de las hojas (ya que, por ejemplo, el musgo tiene hojas de una sola capa de células, carece de epidermis y su cutícula está poco desarrollada), lo que facilita un contacto más directo con los contaminantes y los procesos de acumulación de éstos en el cuerpo del musgo. También es importante que la edad del musgo es homogénea y siempre se parte de material cultivado de la misma edad. Por otra parte, al ser un tipo de biomonitor activo, la red de muestreo es muy regular y uniforme, lo que facilita los procesos estadísticos y de modelización.
- Por el contrario, las hojas de aligustre son biomonitores pasivos, mucho menos versátiles, con una concentración inicial de contaminantes heterogénea. Además, la hoja es un órgano vivo cuyos procesos fisiológicos pueden interferir con la acumulación de contaminantes. La estructura de la hoja es mucho más compleja que la del musgo, ya que tiene varias capas de células, posee una cutícula que la impermeabiliza y una epidermis que limita el intercambio de materiales con el medio. Todo ello puede complicar la entrada de contaminantes dentro de la hoja. Además, la edad de las hojas utilizadas para biomonitorización, que puede modificar la capacidad de acumulación de contaminantes, está determinada por el tipo de muestreo realizado y puede ser lo suficientemente heterogénea para influir sobre los resultados. Finalmente, al tratarse de un biomonitor pasivo, la regularidad de la red de muestreo (algo fundamental en biomonitorización) depende de la presencia de la especie en el territorio estudiado.

Todas las características descritas hacen que las *Mossphere®* sean capaces de discriminar mejor el enriquecimiento en contaminantes. No obstante, nuestro estudio ha demostrado

que cada biomonitor puede tener su utilidad porque, a pesar de que en el caso de las hojas de aligustre no se incluyeron las zonas más enriquecidas en contaminantes (Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada), lo que hizo disminuir drásticamente el gradiente de contaminación, ambos biomonitores pudieron discriminar como zona más limpia la parte oeste del territorio estudiado. Se recomienda, por tanto, continuar los estudios de biomonitorización combinados (utilizando más de un biomonitor) para seguir evaluando la calidad del aire de la ciudad de Logroño y su área metropolitana.

5. Conclusiones

1. El uso de biomonitores en el ámbito urbano representa un instrumento excelente para evaluar la calidad del aire, ya que permite valorar contaminantes que no se miden en las cabinas de vigilancia de calidad del aire, como metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Además, permite evaluar estos contaminantes en escalas mucho más precisas y espacios geográficos más amplios, para obtener mapas representativos de la calidad del aire en ciudades completas y sus espacios periurbanos. De esta manera, se puede zonificar la ciudad en función de la concentración de contaminantes en los biomonitores.
2. Se ha desarrollado una Red Urbana de Biomonitorización de la Calidad del Aire en el área metropolitana de la ciudad de Logroño, que incluye su espacio periurbano. Esta Red está basada en dos biomonitores: musgo trasplantado (mediante el dispositivo esfera de musgo, *Mossphere®*) y el árbol ornamental aligustre (*Ligustrum lucidum*). Por una parte, se dispusieron muestras de *Mossphere®* repartidas regularmente por la ciudad durante un periodo de exposición adecuado (3 meses) en época de alta contaminación, y por otra parte se recolectaron hojas de aligustre simultáneamente a la retirada de las *Mossphere®*.
3. La malla de muestreo basada en esferas de musgo (*Mossphere®*) constaba de 84 puntos en total: 78 en una malla regular de 575 m de lado, 1 en la sede de la Dirección General de Calidad Ambiental y Agua, y 5 en puntos presumiblemente limpios de contaminación de la periferia urbana. Resulta destacable el aumento de esferas finalmente utilizadas frente a las 50 previstas en el Pliego de Prescripciones Técnicas; este aumento se decidió para incrementar la solidez estadística del estudio, a pesar de la consecuencia evidente de aumento de gastos en material y análisis.
4. La malla de muestreo basada en aligustre constaba de 50 puntos en total, elegidos entre los 2.957 árboles censados y distribuidos en una malla de 500 m de lado dentro de la ciudad de Logroño, diseñada de la manera más regular posible.

5. Las *Mossphere*® fueron capaces de discriminar diferentes zonas en la ciudad de Logroño y su área metropolitana de acuerdo con las tasas de enriquecimiento en los distintos contaminantes. Los contaminantes analizados estaban estrechamente correlacionados, lo cual resulta congruente teniendo en cuenta la naturaleza de este procedimiento de biomonitorización, ya que permite que todos los contaminantes se acumulen a la vez.
6. La zonificación realizada por las *Mossphere*® establecía como estaciones presumiblemente contaminadas las localizadas en los Polígonos Industriales de Cantabria (estaciones 9, 10, 11, 22, 23, 24, 26, 37) y La Portalada (estaciones 63, 64, 65, 75, 76), situadas en la parte este del territorio estudiado. Junto a estas estaciones también se agrupaban varias influídas por el tráfico, unas más urbanas (56, la rotonda de la calle Chile, claramente influída por la Circunvalación; 47, junto al CARPA; 20, junto a la Plaza de Toros; 34, en la calle Madre de Dios; y 44, en la calle Pérez Galdós), y otras más periféricas influídas por la AP-68 y/o la Circunvalación (48, 71, 72, 77 y 78). Otra estación muy enriquecida (66) se situaba cercana a graveras del suroeste con gran incidencia de tráfico pesado. En contraposición a las anteriores estaciones, la mayoría de ellas se mostraban mucho menos enriquecidas en contaminantes, como las situadas en espacios abiertos de la parte oeste o noroeste de la ciudad, como El Cubo, Las Norias, El Campillo o el entorno del Parque de los Enamorados.
7. Es importante destacar que no existen aún datos comparativos de la aplicación de las *Mossphere*® en otras ciudades, lo que permitiría poner nuestros datos en un contexto más amplio y evaluar la contaminación que soporta Logroño y su área metropolitana en relación con otros lugares. En efecto, esta comparación sólo resulta aconsejable cuando se utiliza la misma especie como biomonitor, así como la misma duración del periodo de exposición, la misma época del año, etc. No obstante, sí que se puede inferir, a partir de los resultados obtenidos, que las concentraciones obtenidas son relativamente bajas en un amplio contexto de técnicas de biomonitorización empleadas en las últimas décadas. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que el territorio estudiado carece de fuentes de contaminación severa, aunque sería conveniente seguir de cerca la evolución de la calidad del aire en los lugares donde se han encontrado repetidamente altas tasas de enriquecimiento, especialmente en los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada.

8. Las hojas de aligustre también permitieron zonificar el territorio sobre la base de las concentraciones de los contaminantes analizados. Los árboles más enriquecidos en contaminantes eran, principalmente, los números 6 (calle Ebro), 14 (calle Tejada), 15 (Plaza Alférez Provisional), 16 (calle Víctor Pradera), 17 (Duquesa de la Victoria junto a la Glorieta), 18 (calle Villegas), 19 (calle San José de Calasanz), 20 (Luis de Ulloa), 23 (Avenida de Burgos junto a la vía del tren), 25 (calle Pérez Galdós), 28 (Jorge Vigón), 31 (Avenida de Burgos a la salida de la ciudad), 35 (final de República Argentina), 47 (Ortega y Gasset junto a la Circunvalación) y 50 (calle Plantío cerca de la Circunvalación). La mayor parte de estas localizaciones están influidas por tráfico intenso. Por lo tanto, la zona más enriquecida en contaminantes, de acuerdo con los datos de las hojas de aligustre, era casi todo el casco urbano, principalmente la parte norte desde el eje Santa Justa – Pérez Galdós – Pío XII – Lobete hacia el norte hasta el Parque del Ebro, más algunos árboles aislados en la parte periférica del sur (35, 47), sureste (50) y oeste (31). De esta forma, quedaría una amplia zona hacia el oeste y suroeste sin árboles enriquecidos en contaminantes: Valdegastea, Parque de los Enamorados, Yagüe, El Cubo, Parque de San Miguel, La Cava, Fardachón, Las Gaunas y La Guindalera.
9. Como ocurría con las *Mossphere*®, hay que destacar que no existen aún datos comparativos de biomonitorización de metales pesados y HAP con hojas de aligustre en otras ciudades, por lo que no se puede evaluar la calidad del aire de Logroño y su área metropolitana en relación con otros lugares, aunque las concentraciones obtenidas apuntan a que la contaminación es pequeña.
10. No se encontró estructura espacial en los datos obtenidos tanto con las *Mossphere*® como con las hojas de aligustre, salvo débilmente en el caso del Cd. Esto sugiere que el origen de los metales pesados y HAP en la ciudad de Logroño y su área metropolitana se debería a procesos difusos relacionados con el tráfico y actividades industriales, sin que existan focos claros y potentes de estos contaminantes.
11. Se midieron tres variables fisiológicas mediante técnicas no destructivas en hojas de aligustre: rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), y contenido en clorofillas y flavonoides. Estas variables, indicativas de vitalidad o defensa frente a factores ambientales adversos, no permitían zonificar el territorio estudiado en función

de los posibles gradientes de contaminación. No obstante, F_v/F_m disminuía al aumentar la concentración de algunos contaminantes en las hojas, aunque esta reducción no comprometía su fisiología porque seguían conservando valores relativamente altos. Por lo tanto, F_v/F_m puede ser una variable indicadora de efectos fisiológicos negativos debidos a la contaminación, y se recomienda continuar estudiando esta variable en futuros estudios de biomonitorización de calidad del aire en ambientes urbanos mediante árboles ornamentales y, en concreto, aligustre.

12. Se estimó la capacidad que tienen las hojas de aligustre para retirar contaminantes (nitrógeno, metales pesados y HAP) de la atmósfera, lo cual constituye uno de los servicios ecosistémicos más importantes que realizan los árboles ornamentales en las ciudades.
13. Los biomonitores (cuyo uso está ya reconocido en la Ley 34/2007), y en concreto *Mossphere®*, son útiles y probablemente imprescindibles para complementar adecuadamente y con relativo bajo coste la evaluación de la calidad del aire prevista en la legislación vigente en Europa y España, que resulta claramente insuficiente para recoger la variabilidad geográfica y de contaminantes que existe. Además, el uso de biomonitores facilita la información ambiental a los ciudadanos, aspecto también recogido en la legislación, y en cierto modo les hace más partícipes en los procesos de evaluación de la calidad del aire.
14. Como estaba previsto en el Pliego de Prescripciones Técnicas, se ha elaborado un informe resumido en formato *PowerPoint* para uso divulgativo.
15. En el Pliego de Prescripciones Técnicas quedó establecido que se valoraría la elaboración de un artículo en revista científica especializada. El equipo de trabajo está comprometido a llevar a cabo esta tarea, una vez que ya se ha presentado el Informe Final del contrato. Así mismo, el Pliego recogía que se podría realizar una presentación a los medios de comunicación. Esta presentación se realizó al comenzar las actividades del contrato, y el equipo de trabajo también se compromete a efectuar una nueva presentación que incluya los resultados y conclusiones obtenidos.

En resumen, en este **estudio pionero** se ha comprobado la utilidad de las técnicas de **biomonitorización**, y en particular *Mossphere®*, para conocer la calidad del aire en el ámbito urbano. La aplicación concreta de la biomonitorización en la ciudad de Logroño y su entorno periurbano ha permitido **zonificar el territorio estudiado en función de los niveles de los contaminantes analizados**, tanto metales pesados (As, Cd, Hg, Mn, Ni, Pb, Cu, Sb, Pt, Pd, Rh, V y Zn) como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) y Nitrógeno. Específicamente, *Mossphere®* es mejor biomonitor que el otro que se ha utilizado (hojas de aligustre), y es capaz de detectar el **enriquecimiento difuso de contaminantes** en determinados lugares (fundamentalmente los Polígonos Industriales de Cantabria y La Portalada), debido principalmente al **tráfico y las actividades industriales**. Esto facilita a las Administraciones implicadas en la calidad del aire **planificar actuaciones** para conservar y en su caso mejorar dicha calidad, partiendo de una base científica sólida. De acuerdo con lo anterior, se alienta tanto a las Administraciones como a las instancias científicas a promover la **investigación sobre biomonitorización de la calidad del aire** en entornos urbanos y periurbanos, ya que en la actualidad es la única manera de zonificar y sectorializar estos espacios en función de la calidad de su aire. Además, la continuación de este tipo de investigaciones desde una **perspectiva multidisciplinar**, incluida la sanitaria epidemiológica, permitirá relacionar las concentraciones de contaminantes medidas en los biomonitores con los efectos potencialmente nocivos que la presencia de dichos contaminantes en el aire puede tener sobre la salud de las personas y el resto de seres vivos que habitan las ciudades y sus entornos periurbanos. Esto servirá para establecer correspondencias entre las concentraciones de contaminantes en los biomonitores, las concentraciones en el aire, y los efectos sobre los organismos, lo que permitirá encontrar los **umbrales que diferencien los riesgos y definan los intervalos de seguridad**.

6. Agradecimientos

Agradecemos a diversas instituciones y empresas su colaboración en el presente proyecto, en primer lugar a CaixaBank y al Gobierno de La Rioja (Dirección General de Calidad Ambiental y Agua) por la financiación y gestión del proyecto. Así mismo, resultó imprescindible el apoyo del Ayuntamiento de Logroño a través de sus Servicios de Parques y Jardines y Alumbrado Público, ya que sin su autorización y ayuda no hubiera sido posible esta investigación. Además, varias instituciones y empresas nos facilitaron la colocación de *Mossphere®* y la recolección de hojas de aligustre en diversas localizaciones. En este sentido, queremos agradecer la colaboración de Bodegas Campo Viejo, Bodegas Marqués de Murrieta, CEIP Doctor Castroviejo, Centro Comercial Las Cañas, EDAR de Logroño-Bajo Iregua, Logroño Deporte CDM “Las Norias”, Talleres Marín S.L., Viveros Gallardo y Viveros Provedo S.A.

7. Referencias bibliográficas

- Ares A., J.R. Aboal, J.A. Fernández, C. Real, A. Carballeira (2009). Use of the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum* to detect sources of small scale contamination by PAHs. *Atmospheric Environment* 43: 5501-5509.
- Ávila-Perez P., L.C. Longoria-Gandara, G. Garcia-Rosales, G. Zarazua, C. Lopez-Reyes (2018). Monitoring of elements in mosses by instrumental neutron activation analysis and total X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 317: 367-380.
- Barciela Alonso M.C., M. Noya Pardal, M. López Pedrouso, J.R. Aboal, J.A. Fernández, P. Bermejo-Barrera (2015). An environmental-friendly method for As, Cd, Cr, Cu, Ni and Pb determination in terrestrial moss samples by ultrasonic slurry sampling combined with Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Atomic Spectroscopy* 36: 42-48.
- Beike A.K., V. Spagnuolo, V. Lüth, F. Steinhart, J. Ramos-Gómez, M. Krebs, P. Adamo, A. Rey-Asensio, J.A. Fernández, S. Giordano, E.L. Decker, R. Reski (2015). Clonal in vitro propagation of peat mosses (*Sphagnum L.*) as novel green resources for basic and applied research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 1037-1049.
- Capozzi F., S. Giordano, A. Di Palma, V. Spagnuolo, F. De Nicola, P. Adamo (2016a). Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. *Chemosphere* 149: 211-218.
- Capozzi F., S. Giordano, J.R. Aboal, P. Adamo, R. Bargagli, T. Boquete, A. Di Palma, C. Real, R. Reski, V. Spagnuolo, K. Steinbauer, M. Tretiach, Z. Varela, H. Zechmeister, J.A. Fernández (2016b). Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: A systematic evaluation in three European countries. *Environmental Pollution* 214: 362-373.
- Capozzi F., P. Adamo, A. Di Palma, J.R. Aboal, R. Bargagli, J.A. Fernandez, P.L. Mahia, R. Reski, M. Tretiach, V. Spagnuolo, S. Giordano (2017a). *Sphagnum palustre* clone vs native *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the future of the moss bag technique. *Environmental Pollution* 225: 323-328.

- Capozzi F., A. Di Palma, P. Adamo, V. Spagnuolo, S. Giordano (2017b). Monitoring chronic and acute PAH atmospheric pollution using transplants of the moss *Hypnum cupressiforme* and *Robinia pseudacacia* leaves. *Atmospheric Environment* 150: 45-54.
- Concha-Graña E., S. Muniategui-Lorenzo, F. De Nicola, J.R. Aboal, A.I. Rey-Asensio, S. Giordano, R. Reski, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez (2015). Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A* 1406: 19-26.
- Couto J.A., J.R. Aboal, J.A. Fernández, A. Carballeira (2004a). A new method for testing the sensitivity of active biomonitoring: an example of its application to a terrestrial moss. An example of its application to terrestrial moss. *Chemosphere* 57: 303-308.
- Couto J., J.A. Fernández, J.R. Aboal, A. Carballeira (2004b). Active biomonitoring of element uptake with terrestrial mosses: a comparison of bulk and dry deposition. *Science of the Total Environment* 324: 211-222.
- De Nicola F., E. Concha Graña, J.R. Aboal, A. Carballeira, J.A. Fernández, P. López Mahía, D. Prada Rodríguez, S. Muniategui Lorenzo (2016). PAH detection in *Quercus robur* leaves and *Pinus pinaster* needles: standardization of a fast method for biomonitoring purpose. *Talanta* 153: 130-137.
- Di Palma A., D.C. Pardo, V. Spagnuolo, P. Adamo, R. Bargagli, D. Cafasso, F. Capozzi, J.R. Aboal, A.G. Gonzalez, O. Pokrovsky, A.K. Beike, R. Reski, M. Tretiach, Z. Varela, S. Giordano (2016). Molecular and chemical characterization of a *Sphagnum palustre* clone: Key steps towards a standardized and sustainable moss bag technique. *Ecological Indicators* 71: 388-397.
- Díaz-Álvarez E.A., R. Lindig-Cisneros, E. De la Barrera (2018). Biomonitor of atmospheric nitrogen deposition: potential uses and limitations. *Conservation Physiology* 6: 10.1093.
- Foan L., S. Leblond, L. Thoni, C. Raynaud, J.M. Santamaría, M. Sebilo, V. Simon (2014). Spatial distribution of PAH concentrations and stable isotope signatures (delta C-13, delta N-15) in mosses from three European areas - Characterization by multivariate analysis. *Environmental Pollution* 184: 113-122.

- Foan L., M. Domercq, R. Bermejo, J.M. Santamaría, V. Simon (2015). Mosses as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: Comparison with total deposition and evaluation of bioconcentration factors. A year-long case-study. *Chemosphere* 119: 452-458.
- Galuszka A. (2007). Distribution patterns of PAHs and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) BSG and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from different forest communities: A case study, south-central Poland. *Chemosphere* 67: 1415-1422.
- Guidotti M., E. Lucarelli, B. Onorati, G. Ravaioli, C. De Simone, M. Owczarek (2000). Traffic pollution monitoring using mosses as bioaccumulators of metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Annali di Chimica* 90: 145-151.
- Gusev A., O. Rozovskaya, V. Shatalov, W. Aas, P. Nizzetto (2014). Persistent Organic Pollutants in the Environment. EMEP Status Report 3/2014. MSC-E & NILU.
- Harmens H., D.A. Norris, G.R. Koerber, A. Buse, E. Steinnes, A. Ruhling (2007). Temporal trends in the concentration of arsenic, chromium, copper, iron, nickel, vanadium and zinc in mosses across Europe. *Atmospheric Environment* 41: 6673-6687.
- Harmens H., D.A. Norris, G.R. Koerber, A. Buse, E. Steinnes, A. Ruhling (2008a). Temporal trends (1990-2000) in the concentration of cadmium, lead and mercury in mosses across Europe. *Environmental Pollution* 151: 368-376.
- Harmens H., D.A. Norris & the participants of the moss survey (2008b). Spatial and temporal trends in heavy metal accumulation in mosses in Europe (1990-2005). Programme Coordination Centre for the ICP Vegetation, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- Harmens H., D.A. Norris, E. Steinnes, E. Kubin, J. Piispanen, R. Alber, Y. Aleksiainen, 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. Kvietkusr, S. Leblond, S. Liiv, S.H. Magnusson, B. Mankovska, R. Pesch, A. Ruhling, J.M. Santamaria, W. Schroder, Z. Spiric, I. Suchara, L. Thoni, V. Urumov, L. Yurukova, H.G. Zechmeister (2010). Mosses as biomonitor of atmospheric heavy metal deposition: Spatial patterns and temporal trends in Europe. *Environmental Pollution* 158: 3144-3156.

- Harmens H., D.A. Norris, D.M. Cooper, G. Mills, E. Steinnes, E. Kubin, L. Thoni, J.R. Aboal, R. Alber, A. Carballeira, M. Coskun, L. De Temmerman, M. Frolova, L. Gonzalez-Miqueo, Z. Jeran, S. Leblond, S. Liiv, B. Mankovska, R. Pesch, J. Poikolainen, A. Ruhling, J.M. Santamaria, P. Simoneie, W. Schroder, I. Suchara, L. Yurukova, H.G. Zechmeister (2011). Nitrogen concentrations in mosses indicate the spatial distribution of atmospheric nitrogen deposition in Europe. *Environmental Pollution* 159: 2852-2860.
- Harmens H., I. Ilyin, G. Mills, J.R. Aboal, R. Alber, O. Blum, M. Coskun, L. De Temmerman, J.Á. Fernández, R. Figueira, M. Frontasyeva, B. Godzik, N. Goltsova, Z. Jeran, S. Korzekwa, E. Kubin, K. Kvietkus, S. Leblond, S. Liiv, S.H. Magnusson, B. Mankovská, O. Nikodemus, R. Pesch, J. Poikolainen, D. Radnovic, A. Rühling, J.M. Santamaria, W. Schröder, Z. Spiric, T. Stafilov, E. Steinnes, I. Suchara, G. Tabors, L. Thöni, G. Turcsányi, L. Yurukova, H.G. Zechmeister (2012). Country-specific correlations across Europe between modelled atmospheric cadmium and lead deposition and concentrations in mosses. *Environmental Pollution* 166: 1-9.
- Harmens H., D. Norris, G. Mills & the participants of the moss survey (2013a). Heavy metals and nitrogen in mosses spatial patterns in 2010/2011 and long-term temporal trends in Europe. ICP Vegetation Programme Coordination Centre, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- Harmens H., G. Mills, F. Hayes, D. Norris & the participants of the ICP Vegetation (2013b). Air pollution and vegetation. ICP Vegetation Annual Report 2012/2013. ICP Programme Coordination Centre, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- Harmens H., L. Foan, V. Simon, G. Mills (2013c). Terrestrial mosses as biomonitor of atmospheric POPs pollution: A review. *Environmental Pollution* 173: 245-254.
- Harmens H., G. Mills, F. Hayes, K. Sharps, M. Frontasyeva & the participants of the ICP Vegetation (2015a). Air pollution and vegetation. ICP Vegetation Annual Report 2014/2015. ICP Programme Coordination Centre, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- Harmens H., D.A. Norris, K. Sharps, G. Mills, R. Alber, Y. Aleksiayenak, O. Blum, S.M. Cucu-Man, M. Dam, L. De Temmerman, A. Ene, J.A. Fernandez, J. Martínez-Abaigar, M. Frontasyeva, B. Godzik, Z. Jeran, P. Lazo, S. Leblond, S. Liiv, S.H. Magnusson, B. Mankovska, G.P. Karlsson, J. Piispanen, J. Poikolainen, J.M.

- Santamaria, M. Skudnik, Z. Spiric, T. Stafilov, E. Steinnes, C. Stihi, I. Suchara, L. Thoni, R. Todoran, L. Yurukova, H.G. Zechmeister (2015b). Heavy metal and nitrogen concentrations in mosses are declining across Europe whilst some "hotspots" remain in 2010. *Environmental Pollution* 200: 93-104.
- Harmens H., G. Mills, F. Hayes, K. Sharps, M. Frontasyeva & the participants of the ICP Vegetation (2016). Air pollution and vegetation. ICP Vegetation Annual Report 2015/2016. ICP Programme Coordination Centre, Centre for Ecology and Hydrology, Bangor, UK.
- He J., R. Balasubramanian (2010). A comparative evaluation of passive and active samplers for measurements of gaseous semi-volatile organic compounds in the tropical atmosphere. *Atmospheric Environment* 44: 884-891.
- Huang S.J., C.H. Dai, Y.Y. Zhou, H. Peng, K.X. Yi, P.F. Qin, S. Luo, X.S. Zhang (2018). Comparisons of three plant species in accumulating polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the atmosphere: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 16548-16566.
- Ilyin I., O. Rozovskaya, O. Travnikov, M. Varygina, W. Aas (2014). Heavy Metal Transboundary Pollution of the Environment. EMEP Status Report 2/2014. MSC-E & NILU.
- Jiang Y.B., M. Fan, R.G. Hu, J.S. Zhao, Y.P. Wu (2018). Mosses Are Better than Leaves of Vascular Plants in Monitoring Atmospheric Heavy Metal Pollution in Urban Areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15: 10.3390.
- Johnstone D., G. Moore, M. Tausz, M. Nicolas (2013). The measurement of plant vitality in landscape trees. *Arboricultural Journal, The International Journal of Urban Forestry* 35: 18-27.
- Liu X., G. Zhang, K.C. Jones, X.D. Li, X.Z. Peng, S.H. Qi (2005). Compositional fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum plumaeformae* WILS.) from the northern slope of Nanling Mountains, South China. *Atmospheric Environment* 39: 5490-5499.
- MAPAMA (2017). Evaluación de la Calidad del Aire en España 2016 (https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/informe-evaluacion-calidad-del-aire-en-espana-2016_tcm30-431898.pdf).
- MAPAMA.

- Nordberg G.F., B.A. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg (2007). Handbook on the toxicology of metals 3rd edition. Academic Press.
- Oishi Y., T. Hiura (2017). Bryophytes as bioindicators of the atmospheric environment in urban-forest landscapes. *Landscape and Urban Planning* 167: 348-355.
- Oishi Y. (2018). Comparison of moss and pine needles as bioindicators of transboundary polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in central Japan. *Environmental Pollution* 234: 330-338.
- Qu L.L., H.Y. Xiao, H. Guan, Z.Y. Zhang, Y. Xu (2016). Total N content and delta N-15 signatures in moss tissue for indicating varying atmospheric nitrogen deposition in Guizhou Province, China. *Atmospheric Environment* 142: 145-151.
- R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>.
- Reichl F.X. (2004). Guide pratique de toxicologie. De Boeck.
- Ripley B. (2002). The KernSmooth Package. S original by M. Wand, R Port by B. Ripley. URL <http://www.R-project.org>.
- Urosevic M.A., G. Vukovic, P. Jovanovic, M. Vujicic, A. Sabovljevic, M. Sabovljevic, M. Tomasevic (2017). Urban background of air pollution: Evaluation through moss bag biomonitoring of trace elements in Botanical garden. *Urban Forestry and Urban Greening* 25: 1-10.
- Vukovic G., M.A. Urosevic, I. Razumenic, M. Kuzmanoski, M. Pergal, S. Skrivanj, A. Popovic (2014). Air quality in urban parking garages (PM10, major and trace elements, PAHs): Instrumental measurements vs. active moss biomonitoring. *Atmospheric Environment* 85: 31-40.
- Wolterbeek H.T., T.G. Verburg (2004). Atmospheric metal deposition in a moss data correlation study with mortality and disease in the Netherlands. *Science of the Total Environment* 319: 53-64.
- Wu Q.M., X. Wang, Q.X. Zhou (2014). Biomonitoring persistent organic pollutants in the atmosphere with mosses: Performance and application. *Environment International* 66: 28-37.
- Xu Y., H.Y. Xiao, H. Guan, C.J. Long (2018). Monitoring atmospheric nitrogen pollution in Guiyang (SW China) by contrasting use of *Cinnamomum camphora* leaves, branch bark and bark as biomonitor. *Environmental Pollution* 233: 1037-1048.

Zechmeister H.G., S. Dullinger, D. Hohenwallner, A. Riss, A. Hanus-Illnar, S. Scharf (2006). Pilot study on road traffic emissions (PAHs, heavy metals) measured by using mosses in a tunnel experiment in Vienna, Austria. Environmental Science and Pollution Research 13: 398-405.

