

Biomarcadores a nivel de una comunidad de pasto y de una población herbácea forrajera para suelos contaminados por cobre

Jesús Pastor¹, Antonio Gutiérrez-Maroto² & Ana Jesús Hernández³

¹ Departamento de Biología Ambiental. Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid.

² Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

³ Departamento Interuniversitario de Ecología, Sección Departamental de la Universidad de Alcalá, Madrid

Resumen

Correspondencia

J. Pastor

Tel: 917452500

Fax: 915640800

E-mail: jpastor@ccma.csic.es

Recibido: 7 Abril 2003

Aceptado: 24 Abril 2003

El trabajo se propone discutir algunos parámetros que pueden ser considerados como biomarcadores en dos niveles de organización biológica, no usualmente considerados en los estudios sobre biomarcadores, para evaluar el efecto del Cu procedente de una antigua mina en suelos. Se ha elegido una comunidad de pasto aprovechada por ganado vacuno y una población de una leguminosa forrajera, por el interés que ambas tienen en la contaminación de redes tróficas. Se parte de un estudio de campo realizado en el área afectada por una mina de calcopirita en la provincia de Madrid, abandonada hace 37 años y con una escombrera actual de unos 3.500 m³. Una vez conocidos los contenidos de Cu asimilable de la escombrera y de los suelos contaminados circundantes, se tomaron muestras de la capa superficial de suelo en 5 áreas con un contenido creciente de este metal (de 40 a 2.500 ppm) para llevar a cabo dos bioensayos efectuados en condiciones controladas de invernadero: (i) seguimiento de la cobertura vegetal procedente del banco de semillas durante 8 semanas; (ii) siembra de *Lupinus albus* hasta el inicio de la floración (12 semanas). Los resultados obtenidos muestran que los biomarcadores a nivel de población vegetal (altura de la planta, diámetro de la hoja, longitud y anchura del folíolo, vigor de la planta y necrosis de la hoja), dan mejores resultados para revelar un efecto contaminante del cobre asimilable de los suelos que el biomarcador utilizado (cobertura vegetal) a nivel de la comunidad pascícola.

Palabras clave: Minas abandonadas, Ecotoxicología, Cu asimilable, *Lupinus albus*

Abstract

Biomarkers at level of a grassland community and a forage population for soils polluted by copper.

This report discusses several factors that may be considered biomarkers of the effects of soil Cu at two levels of biological organisation. Based on potential implications for trophic systems, this investigation was performed on a pasture community used by cattle and a forage leguminous population. The study area was a 3.500 m³ slag heap in the Madrid province corresponding to a copper pyrite mine in disuse for 37 years. Once the content of absorbable Cu of the tip and surrounding contaminated soil had been established, 3 Kg top soil samples were obtained from 5 areas showing Cu levels of 42, 254, 654, 1153

and 2500 ppm. The soil samples were placed in 22 x 15 x 8 cm containers, in triplicate for each Cu level, to perform the following bioassays under controlled, greenhouse conditions: (i) monitoring plant cover growth from seed-bank seeds for 8 weeks; (ii) seeding of the legume *Lupinus albus* cv. Multolupa until flowering (12 weeks). Soil from the same area but unaffected by the mine (5 ppm Cu) was used as the control. Herbaceous % coverage was the main biomarker used for the plant community and the variables: plant height, leaf diameter, foliole length and width, plant vigour and incidence of leaf necrosis were used as markers of the effects on the fodder population. The data obtained were subjected to analysis of variance using SPSS software. Findings suggest that plant coverage may be considered a biomarker of the Cu content of soils of high Cu concentration, particularly after the seventh week. The morphological characters of the forage population (especially incidence of leaf necrosis) also proved to be good biomarkers of Cu. Contaminating effects of absorbable Cu were best shown by the plant population.

Key words: Derelict mines, Ecotoxicology, available Cu, *Lupinus albus*

Introducción

Un sistema bioindicador es una herramienta para extraer información biológica de un ecosistema y puede ser utilizado como información también para la gestión de sitios contaminados, basada en criterios ecológicos. En los años recientes ha habido una proliferación de términos similares, si bien con algunos matices. El término "biomarcador" puede hacer referencia a las alteraciones producidas por un xenobiótico sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra según se expone en el documento ENTOX/TIWET (1996). Se ha aplicado pues esta palabra a la respuesta biológica frente a la agresión de un contaminante y no a la presencia de éste en algún metabolito de él en el organismo (Walker et al. 1996), así como a la especie humana casi siempre. Sin embargo, el uso de biomarcadores es cada vez más aceptado como una herramienta para la evaluación de riesgos ambientales (Depledge and Fossi, 1994, Migula, 1996, Edwards et al. 1997, Adams et al. 2001) y para la salud del ecosistema (Burger & Gochfeld 2001), especialmente los "biomarcadores de efecto".

Se ha dicho que un buen sistema bioindicador está basado en reconocer y combinar métodos desarrollados en el laboratorio y luego validados en el campo (Straalen & Krivolutsky, 1996), y se reconoce el hecho de que las actividades de bioindicación pueden ser conducidas en varios niveles de integración bio-

lógica (Burger & Gochfeld, 2001). Se puede afirmar que la utilización simultánea de diversos biomarcadores en diferentes niveles de organización biológica es la aproximación más satisfactoria para el diagnóstico de los efectos de los contaminantes sobre individuos y, cuando está asociada a estudios ecológicos (a nivel de poblaciones y comunidades), estos sirven para la evaluación de riesgos.

Entre los métodos actuales se encuentra también la utilización de biomarcadores como instrumentos útiles al servicio de la ecotoxicología. El concepto de biomarcador se ha extendido para referirse a aspectos funcionales de los ecosistemas, tales como medidas de diversidad, conectividad o eficacia. La utilidad de tales medidas ecológicas es obvia de manera intuitiva. La cuestión es saber si los biomarcadores a nivel individual pueden ser utilizados para analizar los ecosistemas, o en otras palabras, si la presencia de individuos saludables significa que el ecosistema está bien. Pero no parece haber dudas en el papel apropiado de biomarcadores fisiológicos y bioquímicos en el estudio de estrés múltiples y su importancia en el presente y en el futuro del manejo medioambiental. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha incluido recientemente el análisis de biomarcadores de nutrición o fisiológicos en el protocolo analítico de emplazamientos contaminados.

Este trabajo se propone discutir algunos parámetros que pueden ser considerados como biomarcadores en dos niveles de organización biológica para evaluar el efecto del Cu asimilable en suelos conta-

minados. Se ha elegido una comunidad de pasto aprovechada por ganado vacuno y una población de una leguminosa forrajera (*Lupinus albus*), por el interés que ambas tienen en la contaminación de redes tróficas.

Material y Métodos

Emplazamiento contaminado de origen:

Se parte de un estudio de campo realizado en el área afectada por una mina de calcopirita en la provincia de Madrid, abandonada hace 37 años y con una escombrera actual de unos 3.500 m³.

Los suelos de la zona están ubicados en cotas inferiores a 1210 m y se clasifican como cambisoles húmicos y dístricos según la FAO. Dado que la mineralización principal de la mina es calcopirita, parte de las formas de Cu son debidas a su presencia como sulfuro mineral, si bien es conocida la especial tendencia del cobre a formar complejos orgánicos (Encabo et al. 1997). Atendiendo a los contenidos de Cu total determinados por estos autores en las fracciones que podrían considerarse teóricamente más disponibles, se ha observado que las muestras situadas a cotas superiores sobrepasan ampliamente el valor límite de contenido total de cobre estipulado para suelos con un pH menor de 7 según la legislación española (BOE, 1990). Estos suelos pueden considerarse por tanto como tóxicos.

En el material depositado en las escombreras y en los suelos del entorno fueron analizados además del Cu, los siguientes elementos: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn mediante absorción atómica. De ellos solo destacaban por elevado el Cu y en algunos puntos el Cd.

Diseño de los bioensayos y variables del monitoreo:

Una vez conocidos los contenidos de Cu total y asimilable de la escombrera y de los suelos contaminados circundantes, se tomaron muestras de la capa superficial de suelo en 5 áreas con un contenido de 42, 254, 654, 1153 y 2500 ppm. 3 Kg de la capa superficial de suelo de cada nivel fueron puestos en cubetas de 22 x 15 x 8 cm provistas de una retícula inferior de drenaje para recoger el exceso de agua y con tres replicaciones por muestra para llevar a cabo dos bioensayos efectuados en invernadero bajo condiciones controladas: (i) seguimiento de la cobertura vegetal procedente del banco de semillas durante 8 semanas; (ii) siembra de *Lupinus albus* cv Multolupa, hasta el inicio de la floración (12 semanas). El suelo control (5 ppm de Cu), corresponde a la mis-

ma área, pero sin influencia de la mina. El recubrimiento vegetal (%) ha sido el biomarcador utilizado para el nivel de comunidad vegetal y los caracteres morfológicos de altura de la planta, diámetro de la hoja, longitud y anchura del foliolo, así como el vigor de la planta e incidencia de necrosis en las hojas, para el bioensayo con la población forrajera.

Los datos se analizaron mediante ANOVA, con los valores transformados logarítmicamente para determinar diferencias entre tratamientos. Hemos usado la opción "DMS" de ANOVA como prueba post-hoc del significado de las diferencias entre medias para los diferentes tratamientos.

Resultados y Discusión

Existen diferencias significativas en el porcentaje de cubierta vegetal, entre los niveles de Cu asimilable del suelo (Tabla 1) a lo largo de las diferentes semanas y también en los valores de la altura máxima y media de la comunidad vegetal (Tabla 2).

| Semana | Cu del suelo | |
|-----------------|--------------|-----|
| | F | P |
| 3 ^a | 7.94 | *** |
| 4 ^a | 10.84 | *** |
| 5 ^a | 13.36 | *** |
| 6 ^a | 12.73 | *** |
| 7 ^a | 12.06 | *** |
| 8 ^a | 10.28 | *** |
| 20 ^a | 10.80 | *** |

*** significativo al nivel del 99,9 %

Tabla 1. Análisis de la varianza del porcentaje del recubrimiento de la comunidad vegetal a lo largo de las diferentes semanas del experimento en los suelos contaminados por Cu.

Table 1. ANOVA of the factor percentage plant cover recorded over the study period.

| Características | Cu del suelo | |
|-----------------|--------------|-----|
| | F | P |
| Comunidad | | |
| Altura máxima | 15.33 | *** |
| Altura mínima | 11.74 | *** |

*** significativo al nivel del 99,9 %

Tabla 2. Análisis de la varianza de dos características de la comunidad herbácea (altura máxima y altura media) en la semana n° 20.

Table 2. ANOVA of 2 characteristics of the herbaceous plant community at week 20.

| Cu suelo (ppm) | Semana | | | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a | 6 ^a | 7 ^a | 8 ^a |
| 5 (control) | 3.8±1.5 a | 7.3±2.5 a | 22.3±13.0 a | 33.8±18.9 a | 42.5±22.2 a | 56.3±17.0 ab |
| 42 | 4.0±1.0 a | 5.3±0.6 a | 19.0±1.8 a | 41.7±12.6 a | 50.0±15.0 a | 66.7±17.6 b |
| 254 | 3.6±1.9 a | 5.2±2.5 a | 18.5±12.1 a | 30.0±18.7 a | 40.5±23.7 a | 51.3±21.4 ab |
| 654 | 4.6±0.9 a | 6.0±0.7 a | 14.0±2.2 ab | 22.0±6.7 ab | 26.0±8.9 ab | 34.4±13.5 ac |
| 1153 | 1.2±0.8 b | 1.4±1.0 b | 2.4±1.7 bc | 4.1±3.6 bc | 5.6±5.7 bc | 14.0±18.4 cd |
| 2500 | 0.5±0.1 b | 0.6±0.1 b | 0.8±0.1 c | 0.9±0.1 c | 1.0±0.1 c | 1.1±0.1 d |

Los tratamientos que presentan una misma letra por columna no difieren significativamente a $p = 0,05$

Tabla 3. Porcentajes de recubrimiento vegetal (valores medios \pm d.t.) y resultados de las comparaciones post-hoc entre niveles.

Table 3. Percentage plant cover (mean values \pm SE) and least-significant difference (LSD) groupings. Comparisons were performed by one-way ANOVA on log transformed data.

| Cu del suelo (ppm) | Cubierta vegetal (%) | Altura máxima (cm) | Altura media (cm) |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 5 (control) | 118.8±22.5 a | 51.8±3.1 a | 16.8±3.6 a |
| 42 | 100.0±20.0 ab | 39.0±11.0 b | 18.3±0.6 a |
| 254 | 103.8±12.5 ac | 33.8±4.7 bc | 14.0±3.7 b |
| 654 | 76.0±18.5 bcd | 33.8±4.1 bc | 12.2±3.6 b |
| 1153 | 50.7±42.4 d | 31.0±2.6 c | 12.7±3.5 b |
| 2500 | 1.3±0.1 e | 10.3±4.5 d | 3.0±1.0 c |

(1) El recubrimiento vegetal sobrepasa el 100% en los casos en los que la vegetación presenta diferentes estratos. Los tratamientos que presentan una misma letra por columna no difieren significativamente a $p = 0,05$

Tabla 4. Porcentajes de recubrimiento vegetal ⁽¹⁾ y alturas máxima y media de la comunidad en la semana n° 20, y resultados de los grupos obtenidos por la aplicación del test post-hoc DMS.

Table 4. Plant cover ⁽¹⁾ and maximum and mean heights of the plant community at week 20. LSD groupings are also given.

En las Tablas 3 y 4 se muestran los valores reales de las medias (junto con sus desviaciones típicas) para mejor comprensión, y no sus valores logarítmicos y los resultados del test DMS. Los tratamientos que tienen la misma letra en una columna no difieren significativamente a la probabilidad $p = 0,05$. El análisis de la varianza permitió observar que el porcentaje de recubrimiento herbáceo tiene cierto papel bioindicador del contenido de Cu para los suelos con niveles más elevados. Ello puede verse a lo largo de las diferentes observaciones, pero especialmente a partir de la semana 8^a. Las alturas máxima y media de la cubierta vegetal de las cubetas tiene un comportamiento similar al recubrimiento herbáceo, pero menos nítido. El análisis de la varianza mostró también que en las 3^a, 4^a, 5^a y 6^a semanas existen diferencias significativas que se mantienen en el recubrimiento de los suelos con niveles elevados de Cu (1153 y 2500 ppm) con respecto a los de nivel igual o infe-

rior a 254 ppm. Si bien entre estos últimos no hay diferencias significativas.

En las semanas 3^a y 4^a, la cobertura vegetal de los suelos de nivel más elevado también se diferencia significativamente de la del nivel 654, pero no en las semanas siguientes.

Al levantar el experimento, al cabo de 20 semanas, ha sido el momento donde hemos observado un mayor número de diferencias significativas en el recubrimiento vegetal de los suelos con diferente contaminación de Cu. Podemos decir por tanto, que el porcentaje de recubrimiento vegetal separa significativamente los suelos con niveles inferiores a 254 ppm (aunque no éstos entre sí) de los suelos con niveles más elevados. Los suelos con 654 ppm de Cu quedan en una posición intermedia, no siendo distintos significativamente de los suelos con niveles más bajos (control, 42 ppm y 254 ppm. Únicamente en la 3^a

| Características de la planta | Cu del suelo | |
|------------------------------|--------------|-----|
| | F | P |
| Vigor | 23.46 | *** |
| Altura planta | 11.43 | *** |
| Diámetro hoja | 15.97 | *** |
| Longitud Foliolo | 16.45 | *** |
| Anchura Foliolo | 19.34 | *** |
| Grado de Necrosis | 7.18 | *** |

*** significativo al nivel del 99,9 %

Tabla 5. Análisis de la varianza de diversas características de una población de *Lupinus albus* cv Multolupa, cuando crece en suelos contaminados con niveles crecientes de Cu asimilable.

Table 5. ANOVA of different characteristics of a *Lupinus albus* cv Multolupa population growing in soil with an increasing extractable Cu content.

y 4ª semana son significativamente diferentes del nivel de 1153 ppm. Ahora bien los suelos con 654 ppm siempre presentan diferencias significativas en la cobertura vegetal con los suelos de nivel más elevado de Cu. Vemos así que el recubrimiento vegetal en estos suelos con 2500 ppm de este elemento se separan de los de nivel inferior a 654 ppm, pero no de los de 1153 ppm.

Al observar en su conjunto, cómo se comporta el incremento porcentual de la cubierta vegetal a lo largo de las diferentes semanas del período de observación (tabla 3), vemos que su comportamiento en los niveles menos elevados (42 y 254 ppm Cu) es similar al del control, y los de niveles 654 y 1153 ppm de Cu tienen un comportamiento intermedio.

Pudimos igualmente observar, al realizar la toma de muestras en campo, que los diferentes niveles de contaminación de Cu fluctúan en su ubicación espacial a lo largo del tiempo, cuando comparamos los resultados de la distribución en el espacio obtenida por nosotros con la de Encabo et al. (1997). Ello implica que el conjunto de la flora existente en el área puede haberse ido adaptando a tolerar diferentes niveles de contaminación de Cu a lo largo de los 37 años en que la mina ha estado clausurada, juntamente con los muchos años que estuvo en explotación, afectando a los suelos del entorno. De ahí, las similitudes de comportamiento de la cubierta vegetal en los suelos con niveles de Cu menos elevados.

El segundo experimento se realizó posteriormente con los mismos suelos y tipo de cubeta. En cada una de las cuales se plantaron 3 semillas de *Lupinus albus* cv. Multolupa que crecieron hasta el inicio de la floración. En este momento se determinaron en cada una de los ejemplares los siguientes caracteres cuantitativos no-destructivos: altura de la planta (cm), diámetro de la hoja (cm), longitud y anchura del foliolo (mm). Para ello se consideraron hojas de edad media. Se tuvieron además en cuenta dos caracteres cualitativos: el “vigor” (plantas de escaso desarrollo a muy vigorosas, en una escala de 7 puntos) e “incidencia de necrosis” (en una escala de 0 a 4).

En las Tablas 5 y 6 podemos ver los resultados del análisis de la varianza para las seis variables estudiadas, y los valores medios de dichas variables, junto con su desviación típica, en los ejemplares de lupino observando que los valores de los parámetros decrecen, en general, en los suelos al aumentar los niveles de Cu. Para realizar estos análisis se ha utili-

| Cu Suelo (ppm) | Vigor | Altura plant (cm) | Diámetro Hoja (cm) | Foliolo Longitud (mm) | Foliolo Anchura (mm) | Grado Necrosis |
|----------------|-----------|-------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| 5 (control) | 6.1±0.8 a | 30.0±4.6 a | 5.7±0.5 a | 25.6±5.7 a | 10.9±1.6 a | 0.8±0.7 a |
| 42 | 3.9±1.7 b | 24.7±5.9 b | 4.6±0.9 ab | 25.0±8.5 ab | 10.7±2.1 a | 1.4±0.5 a |
| 254 | 4.8±1.3 b | 27.0±3.9 ab | 4.4±0.4 b | 22.1±2.8 b | 11.5±2.3 a | 1.3±1.1 a |
| 654 | 1.8±1.0 c | 18.1±7.9 c | 3.3±0.7 c | 17.1±1.8 c | 6.9±1.1 b | 2.2±1.1 b |
| 1153 | 1.4±0.9 c | 17.0±6.5 cd | 3.2±0.6 c | 15.3±1.9 cd | 6.7±1.5 b | 2.6±0.7 b |
| 2500 | 1.2±0.6 c | 11.3±3.8 d | 3.2±0.1 c | 13.5±1.9 d | 7.1±1.4 b | 3.5±0.8 c |

Los tratamientos que presentan una misma letra por columna no difieren significativamente a p = 0,05

Tabla 6. Valores medios ± d.t. de diferentes características de *Lupinus albus* cv Multolupa. Se exponen además los grupos obtenidos por la aplicación del test post-hoc DMS.

Table 6. Mean values ± SE of different characteristics of *Lupinus albus* cv Multolupa. Least-significant difference (LSD) groupings are also provided. Comparisons were performed by one-way ANOVA on log. transformed data.

zado igual que en el experimento anterior, la transformación logarítmica de los datos.

Se observa que en los suelos con 42 y 254 ppm de Cu, la altura de la planta se diferencia de la alcanzada en el control y en los niveles 654 y superiores (Tabla 6). Este parámetro en las plantas que crecen en suelos con un nivel de 254, se diferencia del alcanzado en el nivel 654 y superiores. Los niveles altos se diferencia significativamente de los niveles bajos, menos del de 254 ppm de Cu.

El diámetro de la hoja discrimina los niveles bajos (5 y 42 ppm) de los superiores a 654 ppm. No discrimina, en cambio, en los niveles altos. La longitud del folíolo funciona mejor que la altura de la planta y en el mismo sentido y finalmente, la anchura del folíolo se comporta de forma parecida a la longitud del mismo y a la altura de la planta.

Conclusiones

El porcentaje de cobertura vegetal puede considerarse como un biomarcador para el contenido de cobre de los suelos contaminados con niveles elevados de este elemento, especialmente a partir de la 7ª semana después de la germinación de sus bancos de semillas. Los caracteres cuantitativos considerados a nivel de planta forrajera (*Lupinus albus* cv Multolupa), tienen un comportamiento análogo con respecto a la indicación de los niveles de Cu asimilable en el suelo. También se asemejan al comportamiento observado en la cobertura y altura de la comunidad vegetal.

El hecho más llamativo es la mejor discriminación de la planta en los suelos con un contenido de 654 ppm de Cu asimilable, respecto a los suelos con contenidos más bajos de dicho elemento.

Los caracteres morfológicos estudiados a nivel de población forrajera pueden considerarse buenos biomarcadores respecto al cobre de los suelos y, especialmente, la incidencia de necrosis en los individuos. Se puede deducir que los biomarcadores a nivel de población vegetal, dan mejores resultados para revelar el efecto contaminante del cobre asimilable de los suelos, en relación al utilizado a nivel de comunidad vegetal.

Agradecimientos

Al Proyecto N° 07M/0029/2001 financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y parcialmente al REN2002-02501 del MCyT.

Referencias

- Adams SM, Giesy JP, Tremblay LA & Eason ChT. 2001. The use of biomarkers in ecological risk Assessment: Recommendations from the Christchurch Conference on Biomarkers Ecotoxicology. *Biomarkers* 6: 1-6.
- BOE. 11-II-1990. Real Decreto 1310/90 n° 262.
- Burger J & Gochfeld M. 2001. On developing bioindicators for human and ecological health. *Environmental Monitoring and Assessment* 66: 23-46.
- Depledge MH & Fossi MC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3: 161-172.
- Edwards CA, Subler S, Chen SK & Bogomolov DM. 1996. Essential criteria for selecting bioindicators species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In *Bioindicators Systems for Soil Pollution* (Straalen NM & Krivolutsky DA, eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 67-84.
- Encabo C, Cala V & Gutiérrez-Maroto A. 1997. Evaluación de la dispersión de metales pesados en suelos del entorno de una mina, mediante el método de especiación secuencial química. *Boletín Geológico y Minero* 108: 57-68.
- ENTOX/TIWET 1996. Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology. In *Casarett & Doull's Toxicology* (Klaassen CD, ed.), USA: McGraw-Hill, pp. 883-905.
- Migula PJ. 1996. Constraints in the use of bioindicators and biomarkers in Ecotoxicology. In *Bioindicators Systems for Soil Pollution* (Straalen NM & Krivolutsky DA, eds.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 17-29.
- Straalen NM & Krivolutsky DA (eds.). 1996. *Bioindicators Systems for Soil Pollution*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM & Peakall, DB. 1996. Biomarkers. In *Principles of Ecotoxicology* (Walker CH et al., eds). London: Taylor and Francis, pp. 175-194.