



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**  
**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Evaluación de biomarcadores en *Tillandsia usneoides* L.  
como indicadores de respuesta a la contaminación  
atmosférica**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA**

**M. en BT. GEORGINA MARTÍNEZ RESÉNDIZ**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. ROSA ICELA BELTRÁN HERNÁNDEZ**

**DR. CARLOS ALEXANDER LUCHO CONSTANTINO**



El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del proyecto de investigación titulado “Monitoreo de la contaminación atmosférica de elementos en la región Tula-Tepeji, empleando a *Tillandsia usneoides* L. como biomonitor”. Ciencia Básica 2008. Clave: 106559. Responsable: Dr. Carlos Alexander Lucho Constantino.

Así mismo, se agradece a CONACYT la beca de Doctorado No. 325984 y el apoyo Complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2012. A COCyTEH, por la beca: “Estancias de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación del Estado de Hidalgo 2013”, otorgada a la alumna Georgina Martínez Reséndiz con número de CVU 270809 y número de registro 22466.

## Publicaciones y presentaciones en congresos como parte del presente trabajo

### **“*Tillandsia usneoides* as biomonitor of air pollution”.**

Georgina Martínez-Reséndiz, Carlos Alexander Lucho Constantino, Gabriela A. Vázquez-Rodríguez, Claudia Coronel Olivares, Rosa Icela Beltrán-Hernández

- \*1<sup>st</sup> Biotechnology World Symposium & 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN (2014), Atlihuetzia, Tlaxcala, México
  1. Increase of peroxidase activity in response to accumulation of atmospheric contaminants in *Tillandsia usneoides* L.
- \*XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ (2014), Puerto Vallarta, Jalisco, México.
  1. Respuesta de biomarcadores por la presencia de contaminantes atmosféricos.
- \*1st Global Conference on Environmental Studies (2013), Antalya, Turquía.
  1. Biomarkers of effect in *Tillandsia recurvata* by assimilation of atmospheric metals.
- \*Reconocimiento por la participación como becario en el programa “Estancia de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2013” de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. (2014), Pachuca de Soto, Hidalgo.
- Ciclo de conferencias 2013 “Ciencia, tecnología y desarrollo sustentables”. (2013), Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- \*Simposio Iberoamericano Multidisciplinario de Ciencias e Ingenierías (2013), Pachuca de Soto, Hidalgo, México
  1. Expresión de biomarcadores como indicadores de la presencia de contaminantes atmosféricos.
- \*XXXIII Encuentro Nacional y II Congreso Internacional de la AMIDIQ (2012), San José del Cabo, BCS, México
  1. *Tillandsia usneoides* y *Tillandsia recurvata* como biomonitor de

elementos atmosféricos en la zona minera de Zimapán, Hidalgo, México.

- \*Participación en la I Jornadas Universitarias para la Visibilidad de Producción Científica, realizados los días 23, 24 y 26 de octubre de 2012.
- \*2do Congreso Nacional de Investigación en Cambio Climático (2012), Distrito Federal, México
  1. Evaluación de parámetros bioquímicos en *Tillandsia sp.* por la exposición a contaminantes atmosféricos en la región industrial Tula-Tepeji.
- \*Cátedra nacional de química. CUMex Dr. Mario Molina (2012), Pachuca de Soto, Hidalgo, México.
  1. Evaluación de biomarcadores *Tillandsia usneoides* como indicadores de respuesta a la contaminación atmosférica.

## **DEDICATORIA**

**A mis guías espirituales y académicos**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora R. ICELA Beltrán Hernández, por haberme permitido trabajar en su proyecto de investigación, por su seriedad, paciencia, responsabilidad y rigor académico, que hacen que mi formación como investigador sea una formación completa.

Al doctor CARLOS Alexander Lucho Constantino, por sus conocimientos, orientación, paciencia, persistencia y motivación, que han sido fundamentales para mi formación como investigador, así mismo por su amistad brindada durante este tiempo.

A ROSA ISELA Córdova Rivera, por su apoyo en la realización de las técnicas analíticas llevadas a cabo en este proyecto, como parte de su servicio social.

A GUILLERMO Jaramillo Genchi, por su apoyo en los muestreos y en la realización de las técnicas analíticas durante su permanencia como alumno del “Verano de Investigación 2013”.

A ARGELIA, por dar las facilidades para la instalación de los equipos para llevar a cabo esta investigación en el Municipio de Tlaxcoapan.

A MARY, por dar las facilidades para la instalación de los equipos para llevar a cabo esta investigación en el Municipio de Actopan.

A SAMIRA Islas Valdez, por el apoyo en el montaje de las técnicas analíticas.

Dr. JAVIER Miranda Martín del Campo del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en el uso de equipo analítico.

## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	IV
INDICE DE FIGURAS .....	V
NOTACIONES Y ABREVIATURAS.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
RESUMEN .....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Contaminantes atmosféricos.....	3
2.2. Biomonitorio .....	7
2.2.1. Clasificación de organismos biomonitores por su origen.....	8
2.2.2. Clasificación de los organismos biomonitores por su respuesta .....	8
2.3. Biomarcadores .....	9
2.3.1. Clasificación de los biomarcadores .....	9
2.4. <i>Tillandsia</i> spp como biomonitores de la calidad del aire .....	10
2.5. Antecedentes del uso de <i>Tillandsia usneoides</i> como biomonitor .....	11
2.5.1. Características fisiológicas de <i>T. usneoides</i> L.....	13
2.5.2. Atrapamiento de las partículas de aire y metales pesados por <i>T. usneoides</i> .....	15
2.6. Relación entre biomarcadores y contaminantes atmosféricos .....	16
2.6.1. Peroxidasas (POD).....	17
2.6.2. Proteínas totales.....	19
2.6.3. Ácido ascórbico .....	20
2.6.4. Superóxido dismutasas (SOD) .....	21
2.6.5. Nitrato reductasa (NR).....	23
2.6.6. Clorofila .....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. JUSTIFICACIÓN.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivos específicos .....	28
6. METODOLOGÍA .....	29
6.1. Diseño experimental.....	29
6.2. Sitios de estudio.....	29
6.2.1. Sitio basal .....	29
6.2.2. Sitio emisor .....	30
6.2.3. Sitio receptor.....	30
6.2.4. Sitio control.....	31
6.3. Preparación de material vegetal.....	34

6.4. Determinación de los biomarcadores de exposición: elementos químicos.....	34
6.4.1. Tratamiento de las muestras de <i>T. usneoides</i> L.....	34
6.4.2. Digestión ácida.....	35
6.4.3. Cuantificación de elementos.....	35
6.5. Determinación de biomarcadores de efecto en <i>T. usneoides</i> .....	36
6.5.1. Clorofila a y b.....	36
6.5.2. Proteínas totales.....	37
6.5.3. Actividad peroxidasa (POD) .....	38
6.5.4. Actividad superóxido dismutasa (SOD) .....	39
6.5.5. Actividad nitrato reductasa (NR) .....	39
6.5.6. Ácido ascórbico .....	40
6.6. Monitoreo de NO <sub>x</sub> y SO <sub>2</sub> .....	41
6.7. Monitoreo meteorológico.....	42
6.8. Monitoreo de material particulado del aire .....	42
6.8.1. Tamaño de la muestra.....	42
6.8.2. Preparación de los filtros para su uso.....	42
6.8.3. Determinación de la masa de los filtros .....	43
6.8.4. Digestión de los filtros y cuantificación de los metales .....	43
6.9. Análisis estadístico de los datos .....	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
7.1. Metales en <i>T. usneoides</i> .....	45
7.1.1. Plomo .....	45
7.1.2. Cobre.....	48
7.1.3. Manganeso.....	50
7.1.4. Zinc.....	51
7.1.5. Magnesio.....	53
7.1.6. Calcio.....	54
7.1.7. Hierro.....	56
7.1.8. Níquel y Cadmio .....	58
7.2. Biomarcadores .....	59
7.2.1. Clorofilas y relación clorofila <i>a/b</i> .....	59
7.2.2. Proteínas totales.....	66
7.2.3. Actividad peroxidasa (POD) .....	69
7.2.4. Superóxido dismutasa (SOD) .....	71
7.2.5. Nitrato reductasa (NR).....	73
7.2.6. Ácido ascórbico .....	75
7.3. Material particulado.....	77
7.4. Partículas PM <sub>10</sub> en los sitios de estudio .....	78
7.5. Elementos en el material particulado .....	80
7.6. Gases atmosféricos.....	83

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	88
BIBLIOGRAFÍA .....	90
8. ANEXOS.....	104

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de trabajo en el espectrofotómetro de absorción atómica para cada elemento.....	35
Tabla 2. Diluciones para obtener la curva de calibración del método de Bradford.....	38
Tabla 3. Diluciones para obtener la recta de calibración del método de ácido ascórbico.....	41
Tabla 4. Condiciones de trabajo en la digestión de filtros .....	43
Tabla 5. Concentración de clorofila total ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y relación clorofila a/b en el biomonitor en el experimento 1. ....	61
Tabla 6. Concentración de clorofila total ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y relación clorofila a/b en el biomonitor durante el experimento 2. ....	64
Tabla 7. Concentraciones de elementos en $\text{PM}_{10}$ en Actopan durante el segundo experimento.....	81
Tabla 8. Concentración de elementos en $\text{PM}_{10}$ en Tlaxcoapan durante el segundo experimento.....	82
Tabla 9. Promedio de la masa y concentraciones de elementos en la fracción gruesa de Tlaxcoapan, Hidalgo y el norte de la Ciudad de México.....	83
Tabla 10. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Actopan en el experimento 1. ....	107
Tabla 11. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Tlaxcoapan en el experimento 1.....	108
Tabla 12. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Actopan durante el experimento 2.....	109
Tabla 13. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Tlaxcoapan durante el experimento 2.....	110

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los contaminantes atmosféricos en el ambiente. ....	6
Figura 2. Equipos para la medición directa de contaminantes atmosféricos. ....	7
Figura 3. Morfología de <i>Tillandsia usneoides</i> . ....	14
Figura 4. Hospederos (árboles de mezquite, <i>Prosopis glandulosa</i> ) ....	30
Figura 5. Localización geográfica de los sitios de estudio. ....	32
Figura 6. Forma de exposición de <i>T. usneoides</i> en Actopan y Tlaxcoapan. ....	33
Figura 7. Concentración de Pb en el biomonitor. ....	46
Figura 8. Concentración de Cu en el biomonitor. ....	49
Figura 9. Concentración de Mn en el biomonitor. ....	51
Figura 10. Concentración de Zn en el biomonitor. ....	52
Figura 11. Concentración de Mg en el biomonitor. ....	54
Figura 12. Concentración de Ca en el biomonitor. ....	56
Figura 13. Concentración de Fe en el biomonitor. ....	57
Figura 14. Concentración de clorofila <i>a</i> en el biomonitor en el experimento 1. ....	60
Figura 15. Concentración de clorofila <i>b</i> en el biomonitor en el experimento 1. ....	60
Figura 16. Concentración de clorofila <i>a</i> en el biomonitor durante el experimento 2. ....	63
Figura 17. Concentración de clorofila <i>b</i> en el biomonitor durante el experimento 2. ....	64
Figura 18. Concentración de proteína en el biomonitor durante el experimento 1. ....	67
Figura 19. Concentración de proteína en el biomonitor durante el experimento 2. ....	68
Figura 20. Actividad POD en el biomonitor durante el experimento 1. ....	69
Figura 21. Actividad POD en el biomonitor durante el experimento 2. ....	70
Figura 22. Concentración SOD en el biomonitor durante el experimento 1. ....	72
Figura 23. Concentración SOD en el biomonitor durante el experimento 2. ....	73
Figura 24. Concentración de NR en el biomonitor durante el experimento 1. ....	74
Figura 25. Concentración de NR en el biomonitor durante el experimento 2. ....	75
Figura 26. Concentración de ácido ascórbico en el biomonitor durante el experimento 1. ....	76
Figura 27. Concentración ácido ascórbico en el biomonitor durante el experimento 2. ....	77
Figura 28. Series de tiempo de PM <sub>10</sub> en Actopan y Tlaxcoapan. ....	79
Figura 29. Concentración promedio de PM <sub>10</sub> en los sitios de estudio. ....	80
Figura 30. Rosa de vientos del sitio Actopan. ....	84
Figura 31. Rosa de vientos del sitio Tlaxcoapan. ....	84
Figura 32. Concentración de NO <sub>2</sub> en los sitios de estudio. ....	86
Figura 33. Concentración promedio (24 h) de SO <sub>2</sub> en los sitios de estudio. ....	86

Figura 34. Concentración promedio (8 h) de SO <sub>2</sub> en los sitios de estudio. ....	87
Figura 35. Dispersión de contaminantes desde el sitio emisor.....	104
Figura 36. Dispersión de contaminantes del sitio emisor (Atitalaquia). ....	105
Figura 37. Muestra de planta sin viabilidad .....	106
Figura 38. Muestra de planta del experimento 2 con viabilidad.....	106

## NOTACIONES Y ABREVIATURAS

Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Ce	Cerio
Cr	Cromo
Cs	Cesio
Cu	Cobre
Eu	Europio
Fe	Hierro
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
K	Potasio
Ktpa	Kilo tonelada por año
La	Lantano
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
Nd	Neodimio
Ni	Níquel
NO <sub>x</sub>	Óxidos de nitrógeno
NR	Nitrato reductasa
Pb	Plomo
PM <sub>10</sub>	Partículas menores a 10 micras
POD	Peroxidasas
RTT	Región Tula-Tepeji
Sm	Samario
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
SOD	Superóxido dismutasa
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Tb	Terbio
Yb	Iterbio
Zn	Zinc

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to determine, by an active biomonitoring employing *T. usneoides* and physical monitoring, the usefulness of the following biological parameters: chlorophyll (*a*, *b* and total), ascorbic acid, protein, peroxidase activity (POD) and superoxide dismutase activity (SOD) as biomarkers of effect of chemical elements and gases in the air. The study was carried out in two municipalities: Tlaxcoapan, deposition site of atmospheric pollution emitted by industrial corridor Tula-Vito-Apasco (TVA) and Actopan, the control site. Two experiments were conducted in these sites: the first one from February to October 2012 and the second one from February to June 2013. In both experiments, the aforementioned biological parameters were evaluated, as well as Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb and Zn concentrations in the biomonitor. In the second experiment, besides the above determinations, the metals of study were quantified in PM<sub>10</sub> along with NO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. The results confirmed that Ca and Pb are useful as biomarkers of exposure in *T. usneoides*. Concerning biomarkers of effect, chlorophylls, POD activity and ascorbic acid were the parameters that showed potential to be regarded as such. However, additional studies are needed to confirm this and to delineate the range of concentrations in which they could be employed.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar mediante un biomonitoreo activo con *T. usneoides* y un monitoreo físico, la utilidad de los siguientes parámetros biológicos: clorofila (*a*, *b* y total), ácido ascórbico, proteínas, actividad peroxidasa (POD) y actividad superóxido dismutasa (SOD) como biomarcadores de efecto por elementos químicos y gases atmosféricos. El estudio se llevó a cabo en Tlaxcoapan, sitio receptor de contaminantes atmosféricos provenientes del corredor industrial Tula-Vito-Aspasco (TVA) y en Actopan, como sitio control. Se realizaron dos experimentos: el primero de febrero a octubre de 2012 y el segundo de febrero a junio de 2013. En ambos experimentos se evaluaron los parámetros biológicos antes mencionados, así como las concentraciones de Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn en el biomonitor. En el segundo experimento, además de las determinaciones anteriores, se cuantificaron los metales de estudio en PM<sub>10</sub> y los gases NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>. Los resultados confirmaron que Ca y Pb son útiles como biomarcadores de exposición en *T. usneoides*. En cuanto a los biomarcadores de efecto, las clorofilas, la actividad POD y el ácido ascórbico fueron los parámetros que mostraron potencial para considerarse como tales. No obstante, es necesario realizar estudios que confirmen lo anterior y que delimiten el intervalo de concentraciones en que podrían ser empleados.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el campo de las Ciencias Ambientales, los biomarcadores son expresiones bioquímicas, celulares, fisiológicos o comportamentales que se manifiestan en un organismo como respuesta a la exposición a uno o más contaminantes (Dailianis, 2010). Los estudios sobre biomarcadores en los diferentes compartimentos terrestres han ido en aumento, debido a que proporcionan información sobre el impacto de determinados contaminantes en los seres vivos (Jemec *et al.*, 2009).

Las plantas han sido ampliamente utilizadas como biomonitores de la calidad atmosférica desde hace veinte años, y en los últimos años también se han comenzado a evaluar biomarcadores en ellas. Esta información toxicológica complementa la que provee el monitoreo físico convencional (Mena-Ulecia *et al.*, 2010). Por ello, la observación o análisis de la contaminación del aire mediante el uso de biomonitores se surge como una alternativa potencialmente eficaz y más económica para llevar a cabo mediciones directas en el aire. Los biomonitores permiten determinar la presencia de contaminantes, su ruta destino y efectos en los seres vivos. Esto es especialmente relevante para el monitoreo de áreas extensas.

Las plantas superiores funcionan como biomonitores de contaminación por metales atmosféricos debido a su capacidad de acumulación, lo que a su vez puede ocasionar efectos a nivel bioquímico, como la activación de algunas enzimas que tienen como objetivo evitar la oxidación de las células del organismo, y así prolongar su vida.

*Tillandsia usneoides* L. es una planta epífita, la cual ha sido propuesta por Markert *et al.* (2003) como un biomonitor adecuado para el estudio de aerosoles atmosféricos. El análisis por medio de microscopía electrónica de barrido sugiere que los contaminantes asociados con las partículas son absorbidos por las hojas de la superficie, las escalas y el tallo (Carbone *et al.*, 2012).

Debido a las características anteriores y a su amplia distribución geográfica, *T. usneoides* L., ha sido empleada en diversas partes del mundo como modelo

biológico para la medición de contaminantes atmosféricos como elementos químicos (Calvario, 2012; Martínez-Carrillo *et al.*, 2011; Martínez-Reséndiz, 2011). Sin embargo, no existen estudios de la expresión de biomarcadores de efecto, tales como actividad enzimática (superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), nitrato reductasa (NR), proteínas totales, ácido ascórbico (AA) y clorofilas, como respuesta a la presencia de los contaminantes atmosféricos.

Con base en lo expuesto anteriormente, se realizó este trabajo cuyo objetivo fue identificar, mediante un biomonitoreo activo empleando *T. usneoides* y un monitoreo físico, los biomarcadores de efecto que se correlacionan con la presencia de gases y elementos químicos atmosféricos emitidos por las industrias asentadas en el corredor Tula-Vito-Apasco.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Contaminantes atmosféricos**

La contaminación atmosférica se puede definir como la presencia de un agente potencialmente dañino en cantidades, tiempo y condiciones tales que pueden resultar nocivas para el hombre, los animales, las plantas o el suelo; así como alterar el bienestar o el uso de los bienes (Briggs, 2003).

Existen contaminantes atmosféricos de origen natural y antropogénico. Los primeros son el resultado de procesos propios de la dinámica terrestre (erosión del suelo, erupciones volcánicas, incendios forestales) y de la actividad de los seres vivos (respiración, fermentación, polinización). Los contaminantes antropogénicos provienen principalmente del uso de combustibles fósiles, de actividades industriales, de la agricultura y la ganadería intensiva. Entre las industrias más contaminantes se encuentran las centrales térmicas, las papeleras, las químicas y la siderometalúrgicas (Wichmann-Fiebig, 2005).

Por su origen, los contaminantes del aire se clasifican en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios (también llamados precursores) son aquellos que se mantienen en la misma forma química en que fueron emitidos por la fuente. El monóxido de carbono (CO), los óxidos de azufre y nitrógeno y los vapores emitidos por un vehículo son ejemplos de contaminantes primarios. Los contaminantes secundarios son los que se forman en la atmósfera mediante reacciones químicas y fotoquímicas, que ocurren entre los contaminantes primarios o entre los componentes de la atmósfera. El ácido sulfúrico y el dióxido de nitrógeno son algunos de los contaminantes secundarios más comunes (Daly y Zannetti, 2007).

Por su estado de agregación molecular, los contaminantes pueden existir como partículas y gases. Las partículas pueden ser sólidas o líquidas (p. ej. polvo, humos, neblinas y cenizas). Los contaminantes gaseosos son los que en condiciones normales de presión y temperatura no son líquidos ni sólidos, tal es el caso de los óxidos de nitrógeno, carbono y azufre, así como de los hidrocarburos (Daly y Zannetti, 2007).

El aire contiene una gran variedad de partículas sólidas, líquidas y gases, que tienen una composición química muy diversa y que son removidos de la atmósfera por procesos secos y húmedos (Heintzenberg *et al.*, 2000). La capacidad de la atmósfera para diluir las concentraciones de los contaminantes está determinada por las condiciones meteorológicas. Una atmósfera estable, sin movimiento, propiciará la acumulación de contaminantes y con ello, facilitará la formación de contaminantes secundarios. En cambio, una atmósfera inestable y dinámica difundirá rápidamente los contaminantes debido a la turbulencia atmosférica (Wichmann-Fiebig, 2005).

Los parámetros meteorológicos que se relacionan con la contaminación atmosférica son la dirección y velocidad del viento y la variación de la temperatura con la altura. La variación del viento determina la dirección hacia la cual se puede desplazar la contaminación emitida en un punto. Asimismo, la relación de la temperatura con la altura es un elemento clave para entender los fenómenos de dispersión atmosférica. Cuando un volumen de aire se encuentra a una temperatura superior a la del aire que lo rodea, tiende a ascender dada su menor densidad. Si el aire que asciende atrapa contaminantes, estos ascienden con él y debido a la expansión que experimenta, disminuye la concentración de los mismos (Arancibia y Velásquez, 2001).

De acuerdo con Galán y Fernández (2006), los contaminantes atmosféricos pueden llegar a la superficie terrestre por dos vías:

- 1) Depositación seca: ocurre en ausencia de precipitación y por efecto de la gravedad; las partículas caen a la superficie terrestre (i.e. suelo, agua, vegetación, edificaciones), generalmente cerca de los focos emisores.
- 2) Por depositación húmeda: los contaminantes son absorbidos en gotas, las cuales finalmente precipitan y es así que los contaminantes llegan a la superficie terrestre. Existen dos procesos de depositación húmeda: a) *Washout*, cuando la remoción de los contaminantes sucede dentro de las nubes y b) *Rainout*: cuando la remoción de contaminantes ocurre por

debajo de las nubes, por la caída de lluvia, nieve o granizo. En la figura 1 se muestra un esquema de la ruta de los contaminantes atmosféricos.

El análisis y evaluación de la calidad del aire es un reto, debido a la compleja mezcla de gases y partículas que se forman y a las diferentes reacciones que experimentan. No obstante, se ha buscado la mejor forma de conocer la composición de los contaminantes atmosféricos mediante su medición directa, una vez que se depositan en una superficie, o bien, indirectamente mediante la construcción de modelos matemáticos o con el empleo de biomonitores.

La medición directa con el empleo de equipos (Figura 2) es un método objetivo para conocer la concentración de los contaminantes. Sin embargo, el empleo de estos equipos se ve con frecuencia limitado por su alto costo, lo que dificulta la realización de muestreos por tiempo prolongado y en grandes áreas. Además, este método no proporciona información sobre el efecto de los contaminantes y no está exento de riesgo de contaminación de las muestras, sobre todo cuando las concentraciones a medir son muy bajas (Sandu *et al.*, 2012).

Los modelos matemáticos proporcionan información a diferentes escalas espaciales y temporales, y pueden emplearse para predecir la calidad del aire a futuro. Sin embargo, su exactitud depende de la calidad de los datos usados en su construcción (Poikolainen, 2004).

Para solucionar algunos de los inconvenientes que se presentan al emplear los métodos anteriores y para complementar la información que proporcionan, se ha planteado el uso del biomonitoreo como herramienta de diagnóstico, monitoreo y gestión de la contaminación ambiental.

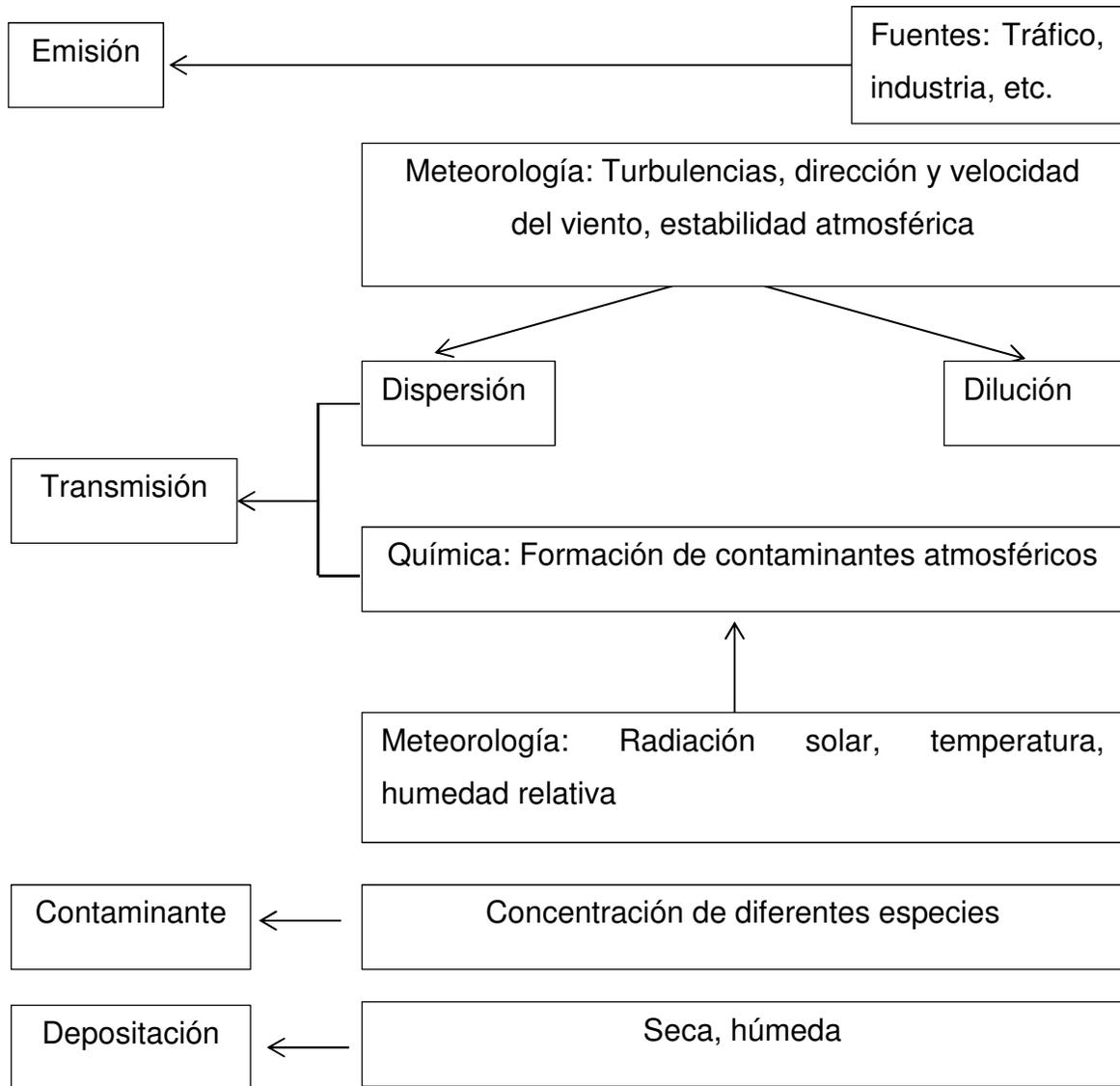


Figura 1. Distribución de los contaminantes atmosféricos en el ambiente.  
Fuente: Galán y Fernández (2006).



Figura 2. Equipos para la medición directa de contaminantes atmosféricos.

Fuente: <https://www.google.com.mx/#=equipo+de+bajo+volumen+para+particulas>

## 2.2. Biomonitorio

Los biomonitores son organismos que proporcionan información cuantitativa acerca del medio en que se desarrollan. Por ello, permiten obtener información sobre las concentraciones de los contaminantes y los variados efectos que estos generan sobre los seres vivos (Market *et al.*, 2003).

El biomonitorio se define generalmente como el uso de organismos para obtener información sobre ciertas características de la biosfera (Chakraborty y Tryambakro, 2006).

Este método es rápido y económico, lo que permite incrementar el número de unidades de observación (muestras y sitios de muestreo) y obtener una visión del efecto de los agentes contaminantes sobre los seres vivos y los ecosistemas, mediante la observación y medición de las diferentes respuestas que los biomonitores pueden desarrollar frente a los contaminantes (Rubiano y Chaparro, 2006).

Con el empleo a gran escala de biomonitores se pueden delimitar las zonas contaminadas, realizar mapas de distribución de contaminantes e identificar las rutas de transporte de los mismos. También se puede obtener información sobre el tipo de fuentes de contaminación, mediante la aplicación de herramientas estadísticas adecuadas. Además, es posible establecer bancos de almacenamiento de muestras seleccionadas (Smodis y Parr, 1999; Cuadra y Romero, 2006).

### **2.2.1. Clasificación de organismos biomonitores por su origen**

De acuerdo a Market *et al.* (2003), los biomonitores se pueden clasificar según su origen:

- 1) Pasivos: organismos que se encuentran de forma natural en el área de estudio. Estos biomonitores permiten conocer la concentración acumulada, así como los efectos provocados por los contaminantes a largo plazo.
- 2) Activos: organismos que se llevan (trasplantan) al área de estudio desde otros sitios, permanecen allí durante un periodo específico de tiempo y bajo condiciones determinadas. Esta modalidad es útil para conocer la velocidad de respuesta del biomonitor a los cambios en su entorno (acumulación, adaptación, etc.).

### **2.2.2. Clasificación de los organismos biomonitores por su respuesta**

Para Markert (2007), los biomonitores pueden ser clasificados de acuerdo a la manera en que responden a la presencia de los contaminantes:

- 1) Indicadores de reacción: son aquellos que tienen una reacción sensible a los contaminantes, por lo que se utilizan especialmente en el estudio de los efectos de los contaminantes: sobre la composición de las especies y sobre su funcionamiento fisiológico y ecológico.
- 2) Indicadores de acumulación: son aquellos que tienen la capacidad de acumular uno o varios contaminantes, por lo que son útiles para detectar la presencia de esos contaminantes y conocer su distribución.

En ambos tipos de indicadores el daño se puede cuantificar visualmente (abundancia relativa, cambios morfológicos, alteraciones etológicas) o a través de la medición de sus respuestas fisiológico-bioquímicas (acumulación de contaminantes, tasa fotosintética, actividad enzimática, etc.) (Cuadra y Romero 2006). A estas respuestas se les llama biomarcadores (Lijteroff *et al.*, 2009).

## **2.3. Biomarcadores**

Los biomarcadores se definen como alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares, que son medibles en los sistemas biológicos, tales como tejidos, células o fluidos (Benford *et al.*, 2000). Los biomarcadores se pueden manifestar como una respuesta a cambios ambientales, entre los que se encuentra la presencia de contaminantes o cambios en su concentración.

La toxicidad de los contaminantes se produce cuando su concentración supera a la capacidad de tolerancia o adaptación de las plantas, de manera que compromete su aptitud para mantenerse saludables. La presencia de contaminantes en organismos indica un grado de contaminación ambiental. Sin embargo, también es necesario conocer los efectos biológicos generados por dichos contaminantes. Por ello, el análisis de biomarcadores es una tendencia cada vez más presente en los programas de vigilancia ambiental (Carballeira, 2003).

Los biomarcadores pueden ser empleados como un sistema de alerta temprana en cada nivel biológico, ya que proveen información acerca de la exposición, el efecto tóxico y la susceptibilidad de los individuos expuestos (Schützendübel y Polle, 2002).

### **2.3.1. Clasificación de los biomarcadores**

De acuerdo con Gil y Pla (2001) y Mussali-Galante *et al.* (2013) los biomarcadores se clasifican en tres grupos: biomarcadores de exposición, biomarcadores de susceptibilidad y biomarcadores de respuesta o efecto.

#### **Biomarcadores de exposición**

Un biomarcador de exposición puede ser un elemento o compuesto exógeno que se encuentra en el organismo como respuesta a su exposición. En el caso de tóxicos acumulativos, la concentración en el biomonitor puede ser proporcional al contenido de dicho tóxico en el ambiente.

Los biomarcadores de exposición se dividen en dos subgrupos: selectivos y no selectivos. Los selectivos son aquellos que se determinan por una medida directa del tóxico o de sus metabolitos, mientras que los no selectivos se determinan mediante el uso de indicadores inespecíficos que se generan como una respuesta a la exposición al tóxico.

### **Biomarcadores de susceptibilidad**

Son biomarcadores que sirven para identificar dentro de una población, a los individuos más sensibles a un tóxico o grupo de tóxicos. Pueden ser metabolitos o marcadores de origen genético que incluyen alteraciones en la estructura cromosómica, tales como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés), el polimorfismo de una actividad enzimática, etc.

### **Biomarcadores de respuesta o efecto**

Son cambios bioquímicos o genéticos que se presentan en un organismo como respuesta a la exposición al tóxico.

Los biomarcadores ideales son aquellos que pueden ser detectados al principio de la exposición antes de que los efectos adversos sean irreversibles.

El amplio uso de plantas como biomonitores se debe a que expresan una gama de respuestas, tales como el aumento de la peroxidación lipídica, la concentración del ácido jasmónico o alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes, por mencionar algunas (Pernía *et al.*, 2008).

## **2.4. *Tillandsia* spp como biomonitores de la calidad del aire**

*Tillandsia* es un género de epífitas, que han sido ampliamente utilizadas como bioindicadores y biomonitores de la contaminación del aire. Estas plantas tienen estructuras especializadas en las hojas para la absorción de humedad y nutrientes disponibles en la atmósfera; estas estructuras también hacen posible la absorción de contaminantes atmosféricos (Elías *et al.*, 2008; Pellegrini *et al.*, 2014).

Entre las especies más empleadas de este género se encuentran: *Tillandsia usneoides*, *Tillandsia capillaris*, *Tillandsia tricholepis*, *Tillandsia permutata* y *Tillandsia retorta*. Las últimas cuatro especies fueron estudiadas por Wannaz y Pignata (2006) para analizar la correlación entre los niveles de metales totales de la depositación atmosférica. También *Tillandsia caput medusae morren* ha sido utilizada para monitorear metales atmosféricos (Pb, Cu y Cd) e identificar las fuentes de estos contaminantes (Brighigna *et al.*, 1997).

Bermúdez y Pignata (2011) compraron la capacidad de bioacumulación de metales en tres especies de *Tillandsia*, y encontraron que dicha capacidad es mayor en *T. recurvata*, seguida por *T. tricholepis* y por último *T. capillaris*.

### **2.5. Antecedentes del uso de *Tillandsia usneoides* como biomonitor**

*T. usneoides* L., ha sido ampliamente empleada como biomonitor debido a que en diversos estudios se ha observado que sus tejidos pueden reflejar la presencia de algunos contaminantes atmosféricos (Brighigna *et al.*, 1997; Pignata *et al.*, 2002; Szczepaniak y Biziuk, 2003; Wannaz y Pignata, 2006). Además, su morfología no varía estacionalmente, lo que hace posible su empleo como biomonitor durante todo el año (Szczepaniak y Biziuk, 2003).

Una de las aplicaciones más extendidas de *T. usneoides* ha sido el biomonitoreo de metales. Se ha reportado que *T. usneoides* puede acumular los siguientes elementos químicos: Al, As, Ba, Br, Ce, Cl, Co, Cu, Fe, K, La, Mg, Sm, Ti, Th, V, Zn, entre otros (Figueiredo *et al.*, 2001; Martínez-Carrillo *et al.*, 2011; Isaac-Olivé *et al.*, 2012). Otros investigadores, como Calvario-Rivera (2012), han cuantificado la medida en que los tejidos de la planta reflejan los contenidos atmosféricos de Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mn, Na, Ni, Pb, Sr y Zn. Asimismo, se ha estudiado la relación entre la acumulación de esos metales y la producción de MDA y clorofilas en el biomonitor (Calvario-Rivera, 2012). Husk *et al.* (2004) encontraron que con *T. usneoides* es posible conocer la distribución espacial y temporal de Fe en la atmósfera, no así de Ca, Cu, K y Mg incluidos también en el estudio.

Ramírez *et al.* (2008) estudió, mediante un biomonitoreo activo con *T. usneoides*, la influencia de la velocidad y dirección del viento en la depositación del material particulado que contenía Cu, Fe, Ca y Mg emitidos por una industria minero metalúrgica en Volta Ronda, Brasil.

Por otra parte, Viana *et al.* (2008) estudiaron la bioacumulación de metales presentes en material particulado en *T. usneoides*, así como la morfología de las partículas suspendidas. Después de 45 días de exposición encontraron la siguiente tendencia de acumulación: Cd<Cr<Pb<Cu<Zn. Con respecto a la morfología hallaron que las partículas eran amorfas y que el 80% de ellas tenían un tamaño <10 µm.

En 2006, Li *et al.* (2012) encontraron que *T. usneoides* es capaz de sobrevivir en presencia de cesio (Cs) y además de acumularlo.

La bioacumulación de tierras raras como lantano (La), cerio (Ce), neodimio (Nd), samario (Sm), europio (Eu), terbio (Tb) e iterbio (Yb); también ha sido estudiada en *T. usneoides*, y se encontró que el biomonitor no acumuló ninguno de estos elementos (Figueiredo *et al.* 2001).

Pyatt *et al.* (1999) compararon la capacidad de bioacumulación de *T. usneoides* L. y el líquen *Parmotrema praesorediosum* y encontraron que efectivamente ambas plantas bioacumulan metales pesados y azufre proveniente de la atmósfera. Con este estudio pudieron concluir que la capacidad de acumulación de *T. usneoides* L. para ciertos metales (como Mn, Ni y Cd) aumenta con la edad de la planta.

Malm *et al.* (1998) y Filho *et al.* (2002) demostraron que *T. usneoides* también es capaz de acumular Hg. En el último estudio también encontraron asociación entre la cantidad de partículas en la superficie de la planta y la concentración de Hg en los tejidos de la misma. Por otra parte, Rodrigues *et al.* (2004) confirmaron la acumulación de Hg en *T. usneoides* L., bajo condiciones controladas a escala laboratorio.

En otros estudios *T. usneoides* ha sido empleada para investigar la biosíntesis de etileno, ya que no se necesita el suelo para su cultivo (característica importante para mediciones a largo plazo) y es sensible para medir este gas. Debido a que posee el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés), no requiere de CO<sub>2</sub> durante el día y se puede demostrar que la producción de etileno es estrictamente dependiente de la luz y no sigue ningún ritmo endógeno, en contraste con otras plantas (Beûler *et al.*, 1998).

Otros autores como Channels *et al.* (2006) han estudiado algunas propiedades de *T. usneoides* como su resistividad eléctrica y paramagnetismo. Martin *et al.* (1981) evaluaron en *T. usneoides* los patrones estacionales de crecimiento, las fluctuaciones de ácido en sus tejidos y la asimilación de <sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub> y su relación con el CAM. De igual forma, Martin *et al.* (2012) estudiaron las respuestas de la presión de turgencia de las células epidérmicas y la actividad fotosintética de las hojas después exponerlas a una elevada humedad.

### **2.5.1. Características fisiológicas de *T. usneoides* L.**

*T. usneoides* L. es una angiosperma que pertenece a la familia Bromeliaceae. Crece desde el sudeste de Estados Unidos hasta Argentina, y se distribuye ampliamente por América Central y del Sur (Garth, 1964). Crece vegetativamente en forma de cadena o fronda, formando estructuras colgantes incluso de 6 m de longitud o más. Su propagación es por medio de semillas o bien por fragmentos desprendidos de la cadena original. Crece en ausencia de suelo, ya que no posee raíces, y el sustrato de donde adquiere sus nutrientes es el aire. Sus flores son pequeñas y fragantes. Es densamente escamosa y cinérea (ceniza) o ferruginosa (color pardo).

*T. usneoides* tiene hojas curvas y filiformes, de 2-7 cm de largo y 1-2 mm de ancho (Figura 3a), las cuales están cubiertas por una capa de tricomas casposas, que dan la apariencia de color gris plateado (Figura 3b, 3c) (Thomas y Lineham, 1986). Posee vainas elípticas, involutas, hasta de 8 mm de largo, láminas filiformes forma parecida a un hilo (Figura 3d, 3e), de menos de 1 mm de diámetro;

escapo casi ausente; inflorescencia reducida a una sola flor (Figura 3f), bráctea floral ovada, apiculada o caudada, muy escamosa, más corta que los sépalos; flores subsésiles; sépalos ovados, agudos, de unos 7 mm de largo, membranáceos, glabros, cortamente unidos en la base; pétalos angostos, de aproximadamente 1 cm de largo, de color verde pálido (o a veces azul); estambres profundamente inclusos, más largos que el pistilo; cápsula hasta de 2.5 cm de largo, cilíndrica, abruptamente terminada en pico corto (Figura 3g) (Hansford *et al.*, 1973).

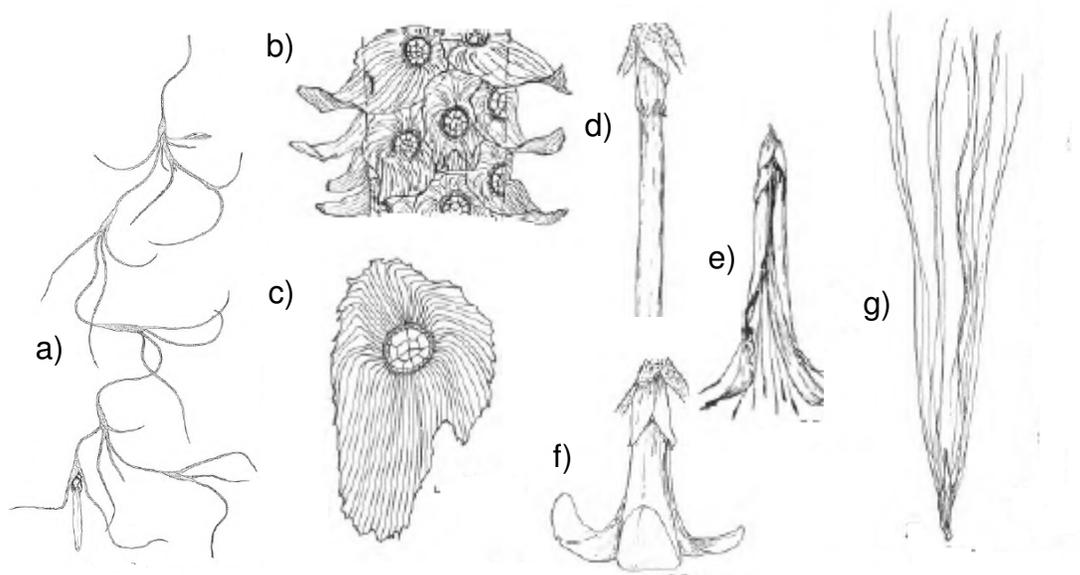


Figura 3. Morfología de *Tillandsia usneoides* a) hojas lineares y filiformes, de 2-7 cm de largo, b) y c) tricomas, d) y e) vainas elípticas, f) flor, g) estambres. Modificado de Hansford *et al.*, 1973.

*T. usneoides* carece de un xilema funcional ya que hay ausencia completa de las raíces, y también por el hecho de que los órganos de absorción de agua (escamas o tricomas, las cuales son estructuras especializadas, unicelulares o multicelulares, con forma de clavo, que forman un escudo en desarrollo horizontal sobre la superficie de la hoja y un eje vertical que penetra en el mesófilo), se encuentran por toda su superficie, con excepción de algunos de los órganos florales. Cuando *T. usneoides* se seca, la hoja es de un color gris, debido a que el aire queda encerrado por las escamas, pero cuando está húmeda, el aire es sustituido por agua, y se produce un color verde oscuro (Billings, 1904; Wagner *et al.*, 2004).

### **2.5.2. Atrapamiento de las partículas de aire y metales pesados por *T. usneoides***

Como se ha mencionado, *T. usneoides* es uno de los biomonitores atmosféricos más empleados para determinar metales en la atmósfera, gracias a su capacidad para acumular y retener sustancias, incluyendo elementos traza. Al carecer de raíces, únicamente toma los nutrientes y contaminantes de la atmósfera mediante los tricomas (Korzekwa *et al.*, 2007). Además de la absorción de nutrientes, los tricomas de *T. usneoides* L. realizan otras funciones, como:

- 1) la protección contra la radiación solar por el aumento de la superficie reflectante,
- 2) el bloqueo mecánico de los nutrientes minerales y partículas orgánicas en las hojas, que luego son transportados dentro de la hoja,
- 3) la protección de los estomas, reduciendo la pérdida de agua por evaporación (Papini *et al.*, 2010). Este mecanismo ocasiona que durante el día los estomas se cierran y con ello se evita el déficit de agua cuando existen altas temperaturas (Malm *et al.*, 1998).

La depositación de contaminantes (o nutrientes) en *T. usneoides* L. puede ocurrir por:

- 1) depositación húmeda (directamente de la lluvia),

- 2) depositación seca (de polvo transportado por el viento),
- 3) depositación de residuos (por la descomposición de moléculas orgánicas de las hojas y la corteza de las plantas hospedadas) y
- 4) fijación microbiana de  $N_2$  en la filósfera (superficie de las hojas) (Abril y Bucher, 2009; Fürnkranz et al., 2008).

El agua entra en contacto con las hojas y es absorbida por las células periféricas de la pantalla, pasa a las células centrales, cuyo flujo es a través de las células del eje subyacente y se distribuye a los tejidos internos a lo largo de un curso establecido, que se puede comparar al que se sigue en las raíces de las plantas terrestres. Cuando la planta está seca, los tricomas mantienen sus partes móviles (escudo) hacia arriba; esto le da a la hoja un color gris claro. Cuando la planta está mojada, el escudo desciende adhiriéndose a la superficie de la hoja con lo cual adquiere su color verde brillante (Scatena y Segecin, 2005; Stefano *et al.*, 2008).

## **2.6. Relación entre biomarcadores y contaminantes atmosféricos**

Los biomarcadores son capaces de reflejar la intensidad de la contaminación del aire y ser empleados como una opción viable en el control de la contaminación atmosférica (Areington *et al.*, 2015). Las pruebas de actividad de las enzimas antioxidantes fueron los primeros biomarcadores de estrés que se utilizaron para evaluar condiciones ambientales adversas. Estas enzimas se pueden determinar en plantas donde los daños de los contaminantes no son visibles. Además de los biomarcadores enzimáticos como las POD, la SOD, la glutamato deshidrogenasa y la NR, también se utilizan otros biomarcadores no enzimáticos para evaluar el efecto de los contaminantes atmosféricos, como las proteínas, el ácido ascórbico y las clorofilas (Nast *et al.*, 1993). Los contaminantes del aire, al igual que los del suelo o los del agua, pueden dañar en primer plano las membranas celulares de las plantas y de esta manera permitir la entrada y acumulación de sustancias tóxicas, lo que a su vez provoca la expresión de ciertos biomarcadores (CBMAPDT, CIS, DELS, NRC, 1989).

### 2.6.1. Peroxidasas (POD)

Las POD están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas enzimas son producidas por una diversidad de organismos, incluidas las plantas. Son oxidorreductasas que catalizan una variedad de reacciones tales como la reducción de peróxidos y la oxidación de una serie de compuestos orgánicos e inorgánicos. Las POD son proteínas hemo, por lo que contienen  $\text{Fe}^{3+}$  y protoporfirina IX como grupo prostético (Bansal y Kanwar, 2013).

En las plantas, las POD también participan en otras funciones tales como la biosíntesis de etileno, la defensa contra infecciones, en la curación de heridas y en la lignificación de la pared celular (McInnis *et al.*, 2006). Las POD han sido empleadas como enzimas capaces de dar respuesta ante la presencia de  $\text{SO}_2$  en el ambiente (Ernst y Peterson, 1994). Khan y Malhotra (1982) encontraron un incremento en la actividad POD en *Pinus banksiana* y *Betula papyrifera* a medida que los tejidos de ambas especies eran expuestos a  $\text{SO}_2$ .

Estudios realizados en Noruega en abetos rojos (*Picea abies*) señalan que el aumento de la actividad POD en las agujas dañadas por contaminantes atmosféricos como el  $\text{CO}_2$  podría atribuirse a los procesos de desintoxicación que se realizan en las plantas. Además, puede existir una relación entre un menor contenido de lignina en las agujas dañadas y una mayor actividad POD (Soukupová *et al.*, 2000).

No solo los gases atmosféricos son capaces de modificar la actividad POD; Chinmayee *et al.* (2014) investigaron el efecto de los metales pesados en la actividad POD en *Jatropha curcas*. Los ejemplares presentaron una disminución de la actividad enzimática cuando las concentraciones de Pb y Cd aumentaron en los tratamientos ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). Por otra parte, la evaluación de la actividad POD ha sido empleada como biomarcador para la detección de individuos resistentes al  $\text{SO}_2$  en semillas de roble (*Quercus petraea* Matt. (Ianculescu y Budu, 2008).

En mayo de 2011, estudios realizados en *Picea abies* L. karst, *Larix decidua*, *Salix alba* L., *Populus tremula* y *Betula verrucosa* Ehrh. comprobaron que los contaminantes estimulan la actividad de las POD. Compararon la actividad de estas enzimas en especies que se encontraban bajo la influencia de una zona contaminada (Calimani y Tarnita, Rumania) y en especies localizadas en un área control considerada no contaminada (Radauti y Suceava, Rumania) (Viorel *et al.*, 2013). Varsheney y Varsheney (1985) reportaron un incremento en la actividad de las POD bajo un variedad de estresores tales como lesiones mecánicas, ataques por patógenos y contaminación ambiental. También encontraron que la respuesta de la actividad de las POD es diferente de acuerdo con la especie de la planta y la concentración de contaminantes. Khan y Malhotra (1982) reportaron que las hojas de las plantas resistentes pueden también tener una alta actividad de POD.

Nyman (1986) evaluó la actividad de las POD en agujas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.), de diferentes edades. El muestreo se realizó en zonas expuestas a dos fuentes industriales de contaminantes atmosféricos. Se observó que el incremento en la actividad de estas enzimas se asocia con la edad de la aguja y con la proximidad a la fuente de emisión.

Ghorbanli *et al.* (2007) estudiaron la actividad POD en *Nerium oleander* y *Robinia pseudo-acacia*, y concluyeron que esta actividad enzimática tiene un gran potencial para ser considerada como un biomarcador, ya que fue capaz de reflejar la calidad del aire ambiental en zonas contaminadas. En el estudio anterior también encontraron que la actividad POD tiene un comportamiento diferente en cada especie. La actividad de las POD se incrementó en ambas plantas localizadas en el sitio contaminado. Sin embargo, solo la actividad en *Robinia pseudoacacia* del sitio contaminado fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), con respecto a las plantas del grupo control.

En las inmediaciones de un complejo industrial de Cubatao en Sao Paulo, Brasil, se realizó un estudio de gases atmosféricos ( $SO_2$ ,  $O_3$  y  $NO_x$ ) con el fin de evaluar la respuesta de las POD en *Tibouchina pulchra* Cogn. Los experimentos de campo incluyeron el muestreo de hojas de árboles maduros en áreas con diferente carga

de contaminación del aire, así como la exposición de árboles jóvenes cultivados en suelos de la región y un estudio sobre los efectos combinados de suelo contaminado y la contaminación atmosférica. En general, la respuesta metabólica de los árboles jóvenes fue más acentuada que la de los árboles maduros, y se observó un claro aumento en la actividad de las POD. Los experimentos mostraron que incluso *Tibouchina pulchra Cogn*, una especie considerada resistente a la contaminación del aire, sufre alteraciones metabólicas como respuesta a la contaminación tanto del aire como del suelo. Aunque la alteración de la actividad POD no se relacionó con un tipo de contaminante específico del aire, se propuso que la información obtenida podría ser utilizada para estimar la carga total de la contaminación y cartografiar zonas con diferente calidad del aire (Klumpp *et al.*, 2003).

### **2.6.2. Proteínas totales**

Las proteínas son importantes macromoléculas que participan en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Las proteínas son el principal componente del citoplasma y de todas las enzimas requeridas para los diferentes procesos fisiológicos en las plantas. Entre otros procesos, las proteínas están involucradas en la catálisis de reacciones bioquímicas (donde participan las enzimas), el transporte a través de membranas, la estructura celular, la generación de energía y el transporte de electrones, solo por mencionar algunos ejemplos. A pesar de su importancia, comparadas con los animales, las plantas contienen niveles relativamente bajos de proteínas; esto se debe a que los carbohidratos estructurales (celulosa) componen la mayor parte de la estructura de las plantas.

Dada la importancia de las proteínas en los diferentes procesos fisiológicos en los seres vivos, han sido empleadas como un biomarcador de efecto para evaluar la presencia de contaminantes atmosféricos. Hamid y Jawai (2009) reportaron una disminución en el contenido de proteínas, carbohidratos y clorofila en plántulas de *Glycine max* (soya) después de exponerlas a una mezcla de SO<sub>2</sub> y NO<sub>2</sub> (2 y 3%, respectivamente) durante 30 minutos al día, tres días a la semana por tres semanas. Estos investigadores observaron que la disminución en los contenidos

de proteínas totales, carbohidratos y clorofila fue mayor cuando se incrementó la concentración de los gases.

En líquenes también se ha encontrado que los contaminantes atmosféricos tienen un efecto negativo en la concentración de proteínas. Fadila *et al.* (2012) realizaron un biomonitoreo activo con *Ramalina farinacea* en la ciudad argelina de Annaba durante los años 2008 y 2009. Encontraron que la proteína total aumentó su contenido en las muestras trasplantadas en los sitios más alejados de las fuentes de contaminación.

### **2.6.3. Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es un compuesto sumamente importante para las plantas. Participa en procesos fisiológicos como la fotosíntesis y el mantenimiento de la homeostasis del sistema redox; también es cofactor de diversas enzimas, y es precursor en la biosíntesis de diversos metabolitos primarios y secundarios. Además desempeña un papel protector, por su fuerte poder reductor, contra las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que se forman a partir de procesos fotosintéticos y respiratorios. Todo parece indicar que los mecanismos de defensa en las plantas pueden causar aumentos de la concentración de ácido ascórbico (Herrera-Martínez *et al.*, 2013).

El ácido ascórbico es un reductor fuerte y activa muchos mecanismos fisiológicos de defensa en las plantas. Su poder reductor es directamente proporcional a su concentración. Sin embargo, se hace presente a niveles de pH alcalinos, debido a que en estas condiciones se aumenta la eficiencia de conversión de hexosas a ácido ascórbico y esto se relaciona con la tolerancia a la contaminación atmosférica.

Mahecha *et al.* (2013) mencionan que varios estudios han revelado que *Ficus racemosa* presenta un alto contenido de ácido ascórbico cuando es expuesto a estrés por contaminantes atmosféricos. Por otra parte, Krishnaveni (2013) realizó un estudio en la India, cuyo objetivo fue analizar los cambios bioquímicos de varias plantas, así como su capacidad de tolerar la contaminación. Uno de estos

cambios bioquímicos evaluados fue el contenido de ácido ascórbico en *Albizia lebeck*, *Albizia amara*, *Tridax procumbens*, *Syzygium cumini*, *Morinda pubescens*, *Delonix elata*, *Annona squamosa*, *Strychnos nuxvomica*, *Alangium salviifolium* y en *Holarrhena antidy dysenterica*. De acuerdo a los resultados, solo se observaron niveles altos de ácido ascórbico en *Albizia lebeck* y *Albizia amara*, mientras que el resto de las plantas presentaron niveles bajos.

Agbaire y Akporhonor (2014) estudiaron el efecto de la contaminación del aire en algunos parámetros fisiológicos (clorofila, contenido relativo de agua, ácido ascórbico, pH en el extracto de las hojas, azúcares insolubles y contenido prolina) en plantas que crecían en el entorno de la empresa siderúrgica Delta, Ovwian Aladja, en Nigeria. El estudio se llevó a cabo en dos sitios, uno control y otro problema, dentro del entorno de la empresa siderúrgica. En general, las plantas en el sitio contaminado mostraron contenidos más altos de los parámetros evaluados, lo que podría indicar que las plantas hicieron ajustes fisiológicos para compensar el estrés ambiental.

Mohammed *et al.* (2015) realizaron un experimento con plantas de *Eruca sativa* Mill, tratadas previamente con ácido ascórbico (0, 50, 100, 200, 300 y 400 mg L<sup>-1</sup>), para evaluar el efecto de algunos contaminantes atmosféricos como O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>2</sub> en tres lugares cercanos a industrias cementeras en la ciudad de Riyadh, Arabia Saudita. Durante el experimento se observó que los contaminantes atmosféricos de los sitios de estudio tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración de minerales en las plantas. Estos minerales se incrementaron de acuerdo al contenido de ácido ascórbico en las plantas.

#### **2.6.4. Superóxido dismutasas (SOD)**

Las SOD son componentes clave del sistema enzimático de defensa antioxidante de las plantas. Sin embargo, no se ha establecido la importancia de la SOD mitocondrial a nivel celular y de toda la planta (Morgan *et al.*, 2008).

El papel de la SOD como sistema de defensa contra la toxicidad del SO<sub>2</sub> fue investigado por Tanaka y Sugahara (1980) utilizando hojas de álamo y espinacas.

Durante este estudio la actividad de la SOD en hojas de álamo se incrementó por el efecto de la fumigación con 0.1 ppm de SO<sub>2</sub>; esta respuesta fue más evidente en las hojas jóvenes. También reportaron que el aumento de la actividad SOD es inhibida por la presencia de cianuro. Las hojas de álamo que presentaron alta actividad de SOD inducida con la fumigación de SO<sub>2</sub> también mostraron más resistencia a una concentración 20 veces más alta de SO<sub>2</sub> (2.0 ppm) que las hojas tomadas como control. Estos hallazgos sugieren que la toxicidad del SO<sub>2</sub> es en parte debido a la súper oxidación del radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y que SOD participa en el mecanismo de defensa contra este gas atmosférico y juega un rol importante en la protección de células vivas contra la toxicidad de algunos contaminantes.

Pereira *et al.* (2005) evaluaron los efectos del fluoruro en las hojas de *Salvinia auriculata* Aubl. El experimento se llevó a cabo bajo condiciones controladas: las plantas se sometieron a una lluvia simulada que contenía KF en concentraciones de 0, 13, 26 y 39 mM durante cinco días consecutivos. Los resultados mostraron la aparición de cambios morfológicos, que incluyeron el desarrollo de lesiones en los tricomas y la cara axial del limbo de la hoja. Las alteraciones en la actividad de la POD, polifenoloxidasas, SOD, catalasa y otros enzimas indican la ocurrencia de daños oxidativos en respuesta al fluoruro. Las alteraciones en la concentración de pigmentos como las clorofilas *a* y *b*, carotenoides y antocianinas, también fueron indicativos de estrés oxidativo, provocados por el fluoruro presente en la lluvia simulada. Por otra parte, existen estudios realizados en otras especies de plantas donde no se muestra una respuesta de los contaminantes atmosféricos ante este biomarcador. Li (2003) evaluó la variabilidad estacional y espacial durante un año de la actividad de la SOD en hojas de *Ficus microcarpa* en ocho sitios de muestreo en el área metropolitana de Taipei y en un sitio de referencia en el área rural. El patrón espacial de la actividad SOD en hojas de higuera no mostró diferencias significativas entre las zonas interiores y exteriores de la zona metropolitana de Taipei. De igual manera, Mutlu *et al.* (2009) estudiaron el efecto de polvo de cemento sobre la diversidad y la actividad de las enzimas antioxidantes de las plantas que crecen alrededor de una fábrica de cemento. Se identificaron treinta y seis especies de plantas a una distancia de 2000 m de la

zona exterior de una fábrica de cemento (Askale-Erzurum, Turquía). De estas, sólo 12 de estas especies se encontraron dentro de 0-100 m (zona con polvo denso) de la fábrica de cemento. Con el fin de evaluar las respuestas antioxidantes de estas 12 especies, se determinó la actividad de la SOD y se encontró que la actividad fue alta en solo tres especies (*Medicago varia*, *Isatis candolleana* y *Astragalus christianus*); en el resto de las plantas los niveles de la actividad de la enzima fueron bajos.

#### **2.6.5. Nitrato reductasa (NR)**

La NR es una metaloflavoproteína inducible, la cual cataliza la reducción de nitrato a nitrito, y la fuente de nitrato pueden ser los óxidos de nitrógeno presentes en la atmósfera. Estudios realizados en plantas han encontrado que la inducción de la actividad NR se debe a la presencia de NO<sub>2</sub> atmosférico (Alekhina *et al.*, 2000).

Hay dos tipos de compartimentos para el nitrato en los tejidos de la planta: el compartimiento de almacenamiento (StP) y el compartimento metabólico (MP), y solo el nitrato del compartimento metabólico (citosol) funciona como sustrato de la NR. La actividad de la NR aumenta cuando la carga de contaminantes del aire es alta y esto puede deberse a una mayor disponibilidad de nitrato en el compartimento metabólico de las plantas (Alekhina *et al.*, 2000).

Las investigaciones de la actividad NR en los tejidos verdes de *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) Schimp. y *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv., en dos localidades (una área con alta contaminación situada en la Alta Silesia y el sitio control, Blonia City Park en Bielsko-Biala, situadas al sur de Polonia) mostraron en ambas especies una alta actividad de la enzima. La actividad NR para *B. rutabulum* varió entre 99 a 9093 nmol g<sup>-1</sup> de masa seca·hora de nitrito y de 265-5135 nmol g<sup>-1</sup> de masa seca·hora de nitrito para *A. undulatum*. En el sitio control los resultados variaron entre 747 a 1077 para *B. rutabulum* y 171-518 nmol g<sup>-1</sup> de masa seca·hora nitrito sintetizado para *A. undulatum*, respectivamente. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), solo entre las dos

especies, pero no entre los hábitats debido probablemente a la alta dispersión y a la pequeña cantidad de repeticiones (Krywult *et al.*, 2013).

#### **2.6.6. Clorofila**

La clorofila es el pigmento de color verde presente en plantas y algas, y es el elemento básico para la transformación de la energía del sol en el proceso de la fotosíntesis.

Existe evidencia de que los contaminantes atmosféricos, como NO<sub>x</sub>, SH<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, hidrocarburos y metales entre otros; pueden afectar la actividad fotosintética de algas, musgos y plantas. Lo anterior ha sido confirmado por investigadores como Otero-Paternina *et al.* (2013) en el alga *Chlorella vulgaris* por efecto del fenantreno; Casierra-Posada y Proveda (2005) en *Fragaria* sp. cv. Camarosa (fresa) por la acción de Mn y Zn, e Yllanes (1994) en plantas de *Zea mays* (maíz) expuestas a Pb. Por ello, la concentración de clorofilas (*a* y *b*) es empleada como un biomarcador de contaminación.

Fidalgo *et al.* (2005) realizaron la evaluación de ciertas plantas vasculares como biomonitores de la contaminación atmosférica por SO<sub>2</sub> en los entornos urbanos de Madrid. Encontraron que una concentración elevada de SO<sub>2</sub> puede producir una modificación en la unión clorofila-Mg, lo que a su vez ocasiona un desplazamiento de las longitudes de onda máximas características de la clorofila *a*.

Por otra parte, los contaminantes atmosféricos aumentan la permeabilidad celular al dañar la integridad de la membrana, lo que trae como consecuencia el cierre de estomas (Verma y Chandra, 2014). Cuando esto sucede hay una acumulación de CO<sub>2</sub> en las cavidades subestomáticas, lo que ocasiona una disminución en la fotosíntesis, y esto a su vez conduce finalmente a la disminución del contenido de clorofila total, agua, y ácido ascórbico (Setter *et al.*, 1980).

La superficie foliar de las plantas está expuesta continuamente a la atmósfera circundante y por lo tanto es el principal receptor de partículas de polvo. Este rasgo físico se utiliza para determinar el nivel de material particulado en los

alrededores, así como la capacidad de las especies de plantas individuales para interceptarlo y lidiar con él. Thawale *et al.* (2011) menciona que la depositación de polvo sobre la cutícula de las hojas reduce la intensidad de la luz incidente debido a la penetración de partículas en la cera epicuticular. Esto dificulta la fotosíntesis, y puede conducir a una acumulación de CO<sub>2</sub> en las cavidades subestomáticas y el cierre de estomas.

De igual manera, Kumar *et al.* (2015) estudiaron la depositación de polvo en especies vegetales cercanas a las autopistas y la respuesta de la depositación de polvo en el aspecto bioquímico de hojas tales como el pH, el contenido relativo de agua y el contenido total de clorofila. El resultado mostró que la máxima depositación de polvo fue en la época de invierno, seguido de las épocas de verano y de lluvias para todas las especies de plantas. Se observó que la clorofila total y el contenido relativo de agua fue menor, mientras que el pH del extracto de hoja se incrementó con el aumento de la carga de polvo. El resultado mostró una correlación negativa entre la depositación de polvo y el contenido relativo de agua, así como entre el contenido de clorofila total y el pH.

La relación entre las clorofilas *a* y *b* también se ha empleado como indicador de alteración de la actividad fotosintética, toda vez que la clorofila *b*, además de ser un pigmento accesorio que aumenta el espectro de absorción de luz, también protege a la clorofila *a* de la oxidación (Shafiqur *et al.*, 2000). Esta oxidación la pueden causar diversos factores, como el exceso de irradiación solar o algunos contaminantes formadores de ROS (Huff, 1982).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El corredor industrial Tula-Vito-Aspasco es un polo importante de desarrollo económico en el estado de Hidalgo, en donde se concentran diversas actividades industriales, como la explotación y aprovechamiento de materiales pétreos, la generación de energía eléctrica a partir de la quema de combustible, la refinación de petróleo, así como actividades agrícolas de riego y temporal, entre otras. Debido a la gran cantidad de emisiones contaminantes que generan estas actividades, la región Tula-Tepeji ha sido catalogada como zona crítica por la legislación mexicana (NOM-085-SEMARNAT-1994).

De acuerdo con el Inventario de Emisiones de 2005 publicado por la autoridad ambiental federal, los sectores industriales de alimentos, la generación de energía, hierro, acero, cemento, cal y petróleo generaron más del 90% de las emisiones nacionales anuales de PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, SO<sub>2</sub>, CO, NO<sub>x</sub> y NH<sub>3</sub>. En el mismo año, en la región de Tula-Tepeji se emitieron 272 kt por año (ktpa) de SO<sub>2</sub>, 35.5 ktpa de material particulado (PM) y 30.8 ktpa de NO<sub>x</sub> (Melgar-Paniagua *et al.*, 2012).

De las emisiones producidas en la región Tula-Tepeji, el SO<sub>2</sub> representa el 78.54%, los NO<sub>x</sub> 11.20%, las PM<sub>10</sub> 10.25% y el resto corresponde a hidrocarburos (>1%). De acuerdo con el análisis de las emisiones totales por municipio, el 97% de los contaminantes criterio que se emiten en la región Tula-Tepeji se genera en industrias ubicadas en el corredor industria de Atitalaquia (SEMARNAT, 2009). Con base en esta información, las principales fuentes de contaminación atmosférica en esta región son: la refinería “Miguel Hidalgo”, la termoeléctrica “Francisco Pérez Ríos”, la zona industrial de Atitalaquia, las fábricas de colorantes y las diferentes granjas de ganado porcino.

Hasta el momento no se cuenta con información acerca de los efectos que pueden producir estos contaminantes sobre los seres vivos en las concentraciones que se presentan en los sitios de la región Tula-Tepeji, donde se depositan mayoritariamente. Por lo que en este trabajo se investigará la relación entre ciertos contaminantes y algunos parámetros biológicos en *Tillandsia usneoides* L., como respuesta a las emisiones generadas en la Región Tula-Tepeji.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En estudios previos se ha comprobado que *Tillandsia usneoides* es un buen biomonitor para algunos elementos químicos y otros contaminantes, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Ahora, en este trabajo, se pretende estudiar cómo se comportan en *T. usneoides* los biomarcadores de efecto: SOD, POD, NR proteínas totales, ácido ascórbico y clorofilas en función de la concentración de ciertos elementos químicos (Ca, Zn, Fe, Cu, Ni, Mg, Mn, Pb y Cr) y gases atmosféricos (SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub>) y si existe correlación entre alguno de estos biomarcadores con un contaminante específico.

## 5. OBJETIVOS

Identificar, mediante biomonitoreo activo y monitoreo físico, los biomarcadores de efecto que se correlacionan con la presencia de gases y elementos químicos atmosféricos en la región industrial de Tula-Tepeji, Hidalgo.

### 5.1. Objetivos específicos

- Seleccionar mediante una revisión bibliográfica los sitios de estudio: sitio receptor y sitio control, para comparar el comportamiento de los biomarcadores de efecto.
- Evaluar la calidad del aire en función de los contaminantes criterio: NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub> y Pb en los sitios de estudio y correlacionarla con la expresión de los biomarcadores de efecto mediante biomonitoreo usando *Tillandsia usneoides*.
- Identificar, de los metales estudiados, cuáles se comportan como biomarcadores de exposición en *Tillandsia usneoides* L. y conocer estadísticamente qué relación guardan con respecto a la expresión de los biomarcadores de efecto.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Diseño experimental**

Inicialmente se planteó realizar un único experimento de un año de duración, para estudiar el comportamiento de los biomarcadores de efecto en función de la variabilidad temporal de los contaminantes y de las condiciones meteorológicas. Sin embargo, debido a algunos inconvenientes técnicos que se presentaron con el equipo de medición de gases y a problemas de supervivencia del biomonitor, la investigación se dividió en dos experimentos.

Para llevar a cabo los experimentos se trabajó con cuatro sitios de estudio como se comenta a continuación.

### **6.2. Sitios de estudio**

Las características y criterios de selección de cada uno de los sitios de estudio se detallan a continuación.

#### **6.2.1. Sitio basal**

Fue el lugar donde se colectaron los ejemplares de *T. usneoides* que se emplearon en los experimentos. Las plantas se encontraban creciendo sobre árboles de mezquite (*Prosopis grandulosa*) (Figura 4).

La localidad de Bella Vista, municipio de Tlanalapa, Hgo., se escogió como sitio basal por ser una zona rural sin actividad industrial. Se localiza fuera de los 25 km del área de influencia de la pluma de dispersión de contaminantes del sitio emisor (Figura 5). Bella Vista se ubica al sur del estado de Hidalgo (20°59'28.86" N, 98°58'29.00" O), cuenta con 297 habitantes y se encuentra a 2460 metros de altitud. Colinda al norte con Singuilucan y Zempoala, al sur con el Estado de México y el Municipio de Tepeapulco; al este con Tepeapulco, y al oeste con el Estado de México y Zempoala.

El clima es templado-frío, con una temperatura media anual de 14.1°C y una precipitación pluvial de 490 milímetros anuales repartidos en los meses de marzo

a septiembre. (<http://mexico.pueblosamerica.com/i/bella-vista-24/>; <http://intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13072a.htm>).



Figura 4. Hospederos (árboles de mezquite, *Prosopis glandulosa*) de los cuales se recolectaron las plantas para los experimentos.

### 6.2.2. Sitio emisor

Fue el corredor industrial Tula-Vito-Aspasco (TVA), donde se ubican tres parques industriales: el de Tula, Tepeji y Atitalaquia, que albergan las industrias que generan más del 90% de las emisiones de  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$ ,  $SO_2$ ,  $CO$ ,  $NO_x$  y  $NH_3$  en el estado de Hidalgo: la Refinería Miguel Hidalgo, las centrales termoeléctricas Francisco Pérez Ríos y Ciclo Combinado de Tula y empresas cementeras y caleras (SEMARNAT, 2009; Figura 5).

### 6.2.3. Sitio receptor

El municipio de Tlaxcoapan, Hgo., se eligió como sitio receptor de alta exposición por encontrarse a 7 km lineales al noreste del corredor industrial TVA, (Figura 5) lo que lo ubica dentro del radio de 25 km la pluma de contaminantes (Anexo 1, Figura 35 y 36) (De Foy *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2009).

Tlaxcoapan, Hgo., se localiza en las coordenadas geográficas, latitud norte de  $20^{\circ}05'43''$  y en longitud oeste  $99^{\circ}13'12''$ , a 2060 msnm. Colinda al norte con los Municipios de Tezontepec de Aldama y Tlahuelilpan; al este con Tetepango, al sur con Atitalaquia y al oeste con Tula de Allende. Posee una superficie semiplana, con uso de suelo primordialmente agrícola. La temperatura media anual es de

17°C, la precipitación pluvial total asciende en promedio a 850 milímetros por año, y el periodo de lluvias es de mayo a junio (Gobierno del estado de Hidalgo, 2014).

#### **6.2.4. Sitio control.**

Se requería de un lugar con características climáticas similares a las del sitio receptor, pero no afectado por los contaminantes provenientes del corredor industrial TVA. El municipio de Actopan, Hgo. (Figura 5) se escogió como sitio control por encontrarse fuera del área de influencia de la pluma contaminante; cuenta con poco desarrollo urbano, circulación automovilística escasa y no presenta actividad industrial. Actopan se localiza a 35 y 42 km lineales al sureste de Tlaxcoapan y del corredor industrial TVA, respectivamente (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13003a.html>).

Actopan, Hgo. está ubicado en las coordenadas geográficas 20° 16' 12" de latitud norte y 98° 57' 42" de longitud oeste, a 2620 msnm. Colinda con Santiago de Anaya al Norte; en su extremo Nororiental con Metztlán; al Oriente, con Atotonilco el Grande; hacia el Sureste se ubica Mineral del Chico, a lo largo de la parte Sur se encuentran El Arenal y San Agustín Tlaxiaca y sobre el Poniente, está localizado el municipio de San Salvador.

La temperatura promedio mensual es de 16.8°C. La precipitación anual es de 463.3 mm, la cual se reparte principalmente entre los meses de junio a septiembre y en menor medida en febrero y diciembre. En general el clima presente en el municipio, se puede catalogar como semi-seco y saludable. (<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13003a.html>).

### ZONA DE ESTUDIO DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

Polígono industrial del sitio emisor  
(corredor industrial Tula-Vito-Apasco)



Localización de los sitios de estudio

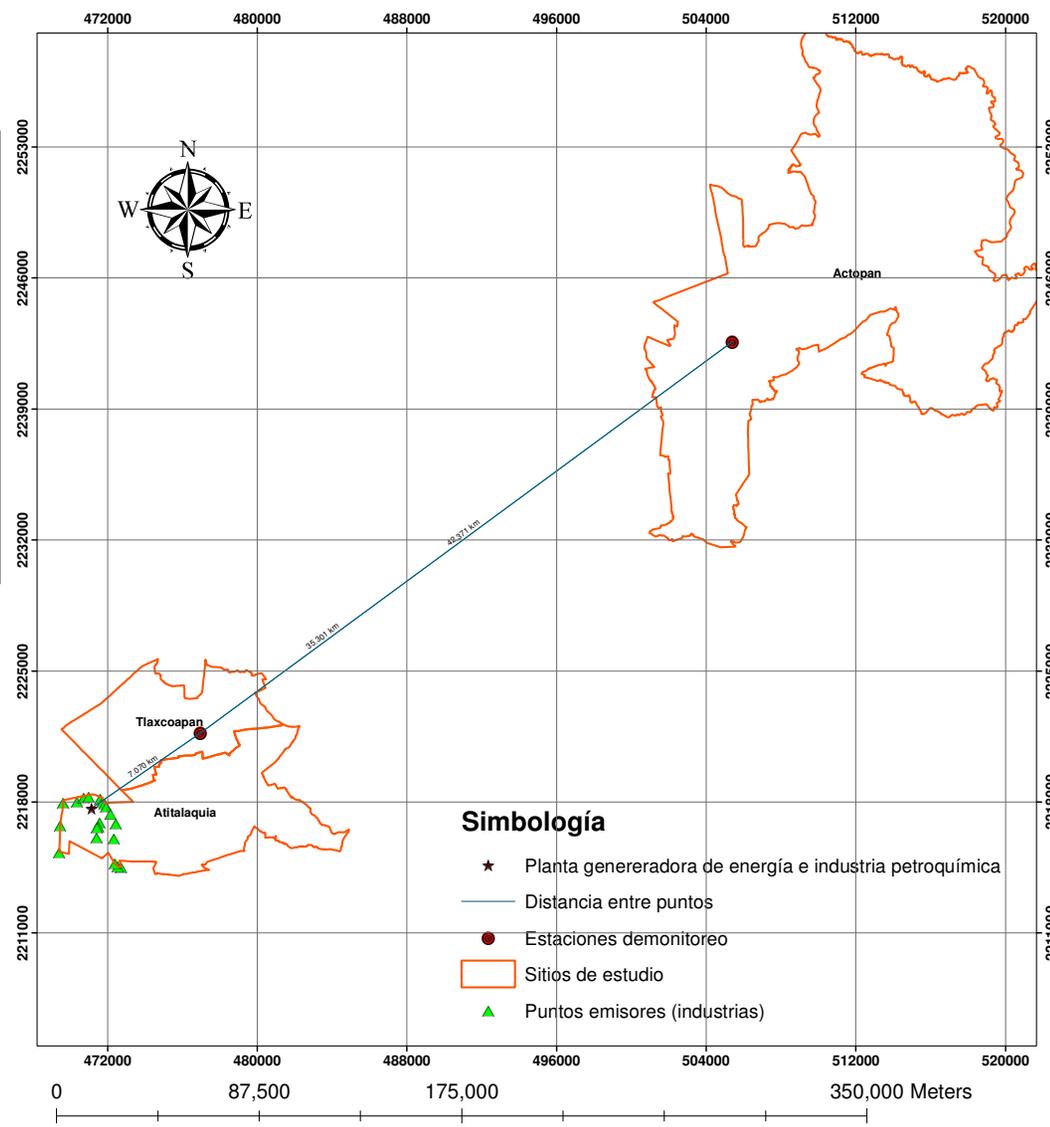
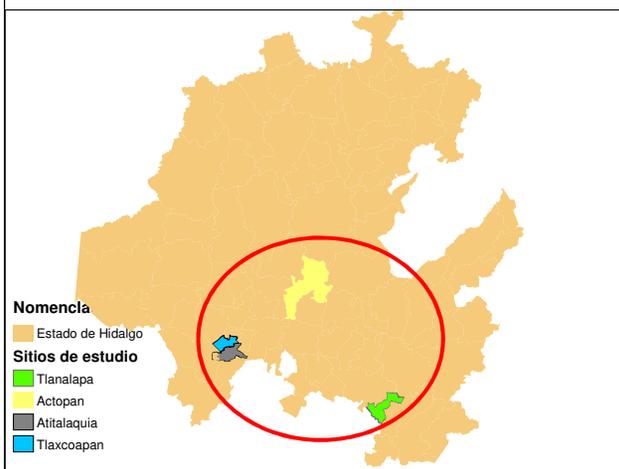


Figura 5. Localización geográfica de los sitios de estudio.

### Experimento 1:

Se colocaron aproximadamente 4 kg de *T. usneoides* en cada sitio: receptor (Tlaxcoapan) y control (Actopan) a fin de tener muestra suficiente para coleccionar tres muestras semanalmente de 25 g cada una durante doce meses. En la figura 6 se muestra la forma en que fueron expuestas las plantas durante 8 meses (febrero a octubre de 2012); transcurrido este tiempo las muestras fueron procesadas, como se describe más adelante, para analizar los biomarcadores: SOD, POD, NR, proteínas totales, ácido ascórbico y clorofilas. También se cuantificó la concentración de elementos químicos (Ca, Zn, Fe, Cu, Ni, Mg, Mn, Pb y Cr) como contaminantes en *T. usneoides* L. Este experimento concluyó a los ocho meses debido a que las muestras del biomonitor se deshidrataron y perdieron viabilidad (Anexo 2, Figura 37a). En este experimento no fue posible medir los gases (NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>) debido a que el equipo se averió y su reparación se prologó más de seis meses.



Figura 6. Forma de exposición de *T. usneoides* en Actopan y Tlaxcoapan.

### Experimento 2:

Para este experimento se colocó una muestra de 4 kg de *T. usneoides* (Figura 6), la cual estuvo expuesta de febrero a junio de 2013, en los sitios receptor y control (Tlaxcoapan y Actopan, respectivamente). Cada 25 días se tomaron 3 muestras homogéneas de 30 g cada una, en las cuales se midieron mismos biomarcadores y elementos químicos que en el experimento 1. En esta ocasión sí se cuantificaron

los gases atmosféricos (NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>) y el material particulado (PM<sub>10</sub>); en este último también se midió la concentración de los elementos cuantificados en el biomonitor. La duración del experimento, al igual que la del anterior, la determinó la viabilidad del biomonitor (Anexo 2, Figura 37b).

### **6.3. Preparación de material vegetal**

Las plantas colectadas se lavaron con agua de la llave, para quitar el exceso de partículas de polvo que las cubría y se dejaron secar al aire. Inmediatamente después se tomó una muestra, se enjuagó con agua destilada, se eliminó el exceso de agua y por último se analizó para determinar los contenidos iniciales (basales) de los biomarcadores y elementos químicos bajo estudio. A continuación se describen cada uno de los análisis llevados a cabo en las muestras iniciales y expuestas.

Cabe hacer la aclaración que las muestras una vez colectadas se guardaban en una bolsa nueva de plástico y se transportaban en una hielera con hielo. Una vez en el laboratorio, se lavaban con agua destilada, se secaban y se separaban 2 g de muestra para analizar inmediatamente los biomarcadores de efecto (clorofilas, proteína total, ácido ascórbico y actividades enzimáticas: súper óxido dismutasa, POD y NR). La porción restante de muestra se congelaba para analizar posteriormente los biomarcadores de exposición (elementos químicos: Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn).

### **6.4. Determinación de los biomarcadores de exposición: elementos químicos**

#### **6.4.1. Tratamiento de las muestras de *T. usneoides* L.**

Las muestras se secaron en un horno (Felisa®, E.U.A) a 110°C durante 48 h. Después se molieron en una licuadora de acero inoxidable y se tamizaron para trabajar con partículas menores a 250 µm.

#### 6.4.2. Digestión ácida

Se pesaron 0.2 g de la muestra y se colocaron en un vaso de digestión al que se adicionaron 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. La digestión se realizó de acuerdo al protocolo método 3052 (EPA, 2009) utilizando un equipo de microondas (CEM MarsX, E.U.A). Terminada la digestión de las muestras y después de haberse enfriado a temperatura ambiente, cada muestra se aforó a 50 mL con HNO<sub>3</sub> al 3% y se guardaron en frascos de plástico, previamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 3%.

#### 6.4.3. Cuantificación de elementos

La determinación de los metales se llevó a cabo por medio de espectrofotometría de absorción atómica (Varian, Spectra AA-800, Australia). Los elementos analizados en el biomonitor fueron: Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn, las concentraciones se expresaron en mg kg<sup>-1</sup> peso seco y se determinaron por sextuplicado. Los parámetros de trabajo utilizados para cada elemento se describen en la Tabla 1. Para realizar la curva de calibración se usaron patrones analíticos de Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn de la marca Merck.

**Tabla 1.** Parámetros de trabajo en el espectrofotómetro de absorción atómica para cada elemento.

Elemento analizado	Longitud de onda (nm)	Concentración del estándar (ppm)	Slit (nm)	Tipo de llama
Ca	239.9	40	0.2	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> O
Cd	228.8	1	0.5	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Cu	324.7	2	0.5	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Fe	372.0	10	0.2	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Mg	202.6	10	0.1	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Mn	279.5	5	0.2	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Ni	232.0	1	0.2	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Pb	217.0	10	0.1	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Zn	213.9	5	1.0	Aire-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

## 6.5. Determinación de biomarcadores de efecto en *T. usneoides*

### 6.5.1. Clorofila a y b

La determinación de clorofila *a* se realizó espectrofotométricamente empleando acetona como extractante (Menéndez, 2009). Se pesaron 0.2 g de cada muestra, se cortaron en secciones de aproximadamente 1 cm de largo, se lavaron con agua destilada, y se secó el exceso de agua con papel absorbente. Después, cada muestra se maceró en un mortero con 10 mL de acetona, evitando el contacto de la muestra con la luz para disminuir la degradación de la clorofila. Los extractos recuperados se almacenaron en frascos de vidrio en total oscuridad dentro del refrigerador (3°C) durante un día. Transcurrido este tiempo, el extracto se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min. Se midió la absorbancia a 480, 630, 647, 664 y 750 nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10 vis, E.U.A).

Las determinaciones se realizaron por sextuplicado. Para la cuantificación de la concentración de la clorofila *a* y *b* se utilizó la ecuación (1 y 2) de Jeffrey y Humphrey (1975). Los resultados se reportaron en mg kg<sup>-1</sup>.

$$\text{Clorofila } a(\text{mg kg}^{-1}) = (11.93 * A_{664}) - (1.93 * A_{647}) * \frac{\text{Vol (L)}}{\text{peso de la muestra}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Clorofila } b(\text{mg kg}^{-1}) = (5.43 * A_{664}) + (21.03 * A_{647}) - (2.66 * A_{630}) * \frac{\text{Vol (L)}}{\text{peso de la muestra}} \quad \text{Ecuación 2}$$

### **Procedimiento general para la obtención de extracto vegetal para las determinaciones de proteínas, y actividades enzimáticas en *T. usneoides***

Se pesaron 0.2 g de muestra de *T. usneoides* L., y se maceraron en un mortero con 6 mL de solución tampón 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5). La suspensión se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. El extracto se conservó en un baño de hielo para mantener las condiciones ideales (3°C) para cada una de las determinaciones.

A continuación se explica el procedimiento de cada una de las técnicas en las cuales se empleó el extracto antes obtenido.

### 6.5.2. Proteínas totales

Para la evaluación del contenido de proteína, se transfirieron a un tubo de 500  $\mu$ L del extracto obtenido (apartado 6.5) de cada una de las muestras. A cada tubo se le se le agregaron 500  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Después de 15 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10 vis, E.U.A) (Bradford, 1976).

Para la obtener la curva de calibración del método se preparó una solución stock con una concentración de 100 mg mL<sup>-1</sup> de albúmina sérica bovina. Se realizaron las diluciones que se muestran en la tabla 2 en una serie de tubos, y cada dilución se realizó por triplicado. Una vez agregado el reactivo de Bradford a cada tubo, se dejó transcurrir 15 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm antes de transcurrida una hora.

Los cálculos se realizaron usando la ecuación 3.

$$Proteína\ total\ (\mu g\ g^{-1}) = \frac{Abs-b}{m} * \frac{vol\ de\ extracto}{peso\ de\ planta} * F \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Volumen de extracto: 6 mL

F: factor dilución

b: ordenada al origen

m: pendiente

Tabla 2. Diluciones para obtener la curva de calibración del método de Bradford.

Tubo	Concentración solución ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Vol. Stock ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Bradford ( $\mu\text{L}$ )
0	0	0	500	500
1	2.5	12.5	485	500
2	5	25	470	500
3	7.5	37.5	455	500
4	10.0	50	440	500

### 6.5.3. Actividad peroxidasa (POD)

Para determinar la actividad POD, en una celda de  $1\text{ cm}^2$  se colocaron  $820\ \mu\text{L}$  de solución de Tris-HCl (pH 7.5) (a  $25^\circ\text{C}$ ),  $50\ \mu\text{L}$  de solución de guayacol,  $100\ \mu\text{L}$  de extracto del extracto obtenido (apartado 6.5) y  $30\ \mu\text{L}$  de solución de peróxido de hidrógeno. Enseguida se midió la absorbancia a  $436\text{ nm}$  en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10 vis, E.U.A), utilizando como blanco la mezcla reactiva sin extracto enzimático (Puter, 1974; Malik y Singh, 1980).

Los cálculos correspondientes se realizaron de acuerdo a la Ecuación 4 expresando la actividad POD en  $\mu\text{mol min g}^{-1}$ .

$$POD (\mu\text{mol min g}^{-1}) = \frac{m \frac{Abs}{min} * vol.ensayo(mL) * F}{\epsilon(M^{-1}cm^{-1}) * b(cm)} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

Volumen de ensayo:  $1\text{ mL}$

F: factor dilución

$\epsilon$ : coeficiente de extinción  $6.39\ \mu\text{mol}$

b: distancia de la celda  $1\text{ cm}$

m: pendiente

#### 6.5.4. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

En un tubo se colocaron 0.2 mL de EDTA/cianuro, 0.1 mL de NBT (Nitroazul de tetrazolio) y 3 mL de buffer (fosfato dibásico y monobásico 0.067 M) además de 1 mL de extracto (apartado 6.5). Los tubos fueron incubados durante 10 minutos en una incubadora a 45 °C en cuyo interior se colocó una bombilla fluorescente de 40 W. Transcurrido este tiempo se leyeron las muestras a 560 nm (Sadasivam y Manickam, 1996)

La actividad SOD se determinó de acuerdo a la ecuación 5 expresando los resultados en U mg<sup>-1</sup>.

$$SOD(U\ g^{-1}) = \frac{(Af_{560}) - (Ai_{560})}{\frac{1}{2} \text{ de máxima inhibición} * \text{vol. de ensayo} * t}$$

Ecuación 5

Donde:

$Af_{560}$ : absorbancia después de la exposición a la bombilla

$Ai_{560}$ : absorbancia antes de la exposición a la bombilla

$t$ : tiempo transcurrido de exposición a la bombilla

Volumen de ensayo: 2 mL

1/2 de máxima inhibición: 50

#### 6.5.5. Actividad nitrato reductasa (NR)

En un tubo se agregaron 0.5 mL de solución buffer de fosfatos (pH 7.5), 0.2 mL de solución nitrato de potasio 0.1 M, 0.4 mL de solución NADH 2 mM, 0.7 mL de agua y 0.2 mL de extracto (apartado 6.5). Se empleó un blanco con los mismos reactivos, excepto el extracto, que se sustituyó con agua (apartado 6.5). Todas las muestras se incubaron a 30°C durante 15 minutos; la reacción se terminó con la adición de 1 mL de sulfanilamida al 1% y 1 mL del reactivo de naftiletilendiamina al 0.02%. Se esperaron 30 minutos para medir la absorbancia a 540 nm (Sadasivam y Manickam, 1996).

Se generó una recta de calibración a partir de la absorbancia de los estándares de nitrato preparados en los intervalos de 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 mg

mL<sup>-1</sup> empleando una solución patrón nitrito de sodio. La actividad se expresa en  $\mu\text{mol de NO}_2 \text{ min g de planta}^{-1}$  acuerdo a la ecuación (6):

$$NR(\mu\text{mol de } \frac{\text{NO}_2}{\text{min g de muestra}}) = \frac{(\text{Abs} - \frac{b}{m}) * (\text{vol. de ensayo})}{\frac{\text{peso de muestra} * 46}{\text{tiempo de incubación}}} * F \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

Abs: absorbancia a 540 nm

b: ordenada al origen

m: pendiente

Volumen de ensayo: 4 mL

Peso de la muestra: 0.200 g

Tiempo de incubación: 15 min

F: Factor de dilución del extracto

### 6.5.6. Ácido ascórbico

Para la obtención del extracto se trituraron 0.2 g de *T. usneoides*, y se agregaron 6 mL de solución de ácido oxálico al 4%. La mezcla anterior se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Todo el sobrenadante se transfirió a otro tubo al cual se le añadieron 25 gotas de agua de bromo, agitando constantemente. Posteriormente se agregó ácido oxálico al 4% hasta completar un volumen de 10 mL. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de esta solución y se transfirieron a otro tubo, a los cuales se le adicionaron 950  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 1 mL de 2,4 dinitrofenilhidracina al 2% y dos gotas de tiourea al 2%, y se incubó a 37°C durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico al 80% a cada tubo y se leyó la muestra a 540 nm (Sadasivam y Manickam, 1996).

Los cálculos finales se realizaron de acuerdo a la ecuación (7) para obtener la concentración de ácido ascórbico en  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

$$\text{Ác. ascórbico } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{(\text{Abs} - \frac{b}{m}) * \frac{\text{vol. aforado}}{\text{vol. de la alicuota}}}{\text{peso de la muestra} * f.d.i} \quad \text{Ecuación 7}$$

En la siguiente tabla (3) se presentan las características de la recta de calibración.

Tabla 3. Diluciones para obtener la recta de calibración del método de ácido ascórbico.

<b>Tubo</b>	<b>Concentración solución ácido ascórbico (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>2,4 dinitrofenilhidracina al 2% (mL)</b>	<b>Agua destilada (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Tiourea al 2% (gotas)</b>
0	0	1	3000	2
1	75	1	2925	2
2	150	1	8850	2
3	225	1	2775	2
4	300	1	2700	2
5	375	1	2625	2
6	750	1	2250	2

Donde:

b: ordenada al origen

m: pendiente

Volumen de extracto: 6 mL

Volumen aforado: 10 mL

Factor de dilución: 6 mL

### 6.6. Monitoreo de $\text{NO}_x$ y $\text{SO}_2$

El monitoreo de gases atmosféricos ( $\text{NO}_x$  y  $\text{SO}_2$ ) se realizó con un equipo *Aeroqual* (AQM60, Nueva Zelanda). El equipo fue programado para que en lapsos de dos minutos cuantificara la concentración de los gases. El equipo opera de manera automática, de tal modo que los datos fueron recuperados por medio de la una computadora.

Debido a que únicamente se contaba con un equipo para el monitoreo de los gases, la medición de los mismos se realizó de manera alternada, cada 25, días entre Tlaxcoapan (sitio receptor) y Actopan (sitio control) hasta concluir cada experimento.

## **6.7. Monitoreo meteorológico**

La unidad *Aeroqual* contaba con un accesorio con el cual se llevó a cabo el monitoreo meteorológico. Para el registro de datos meteorológicos, como temperatura, dirección del viento, presión atmosférica y precipitación, el equipo se programó para que en lapsos de cada dos minutos estos datos fueran registrados. El accesorio fue orientado hacia el Norte, como lo indicaba el manual de usuario.

## **6.8. Monitoreo de material particulado del aire**

El monitoreo de partículas se llevó a cabo empleando unidades de bajo volumen ( $5 \text{ L min}^{-1}$ ). (minivol, Airmetrics, EU). Antes de cada muestreo se calibró el equipo a un flujo de  $5 \text{ L min}^{-1}$  con un temporizador Airmetrics. Se emplearon filtros de policarbonato de 47 mm de diámetro con tamaño de poro de  $0.4 \mu\text{m}$  (Nucleopore, modelo 9113022). La selección de los filtros se basó en función de las siguientes propiedades: distribución uniforme de tamaño de poro; superficie lisa, transparente y delgada; así como bajo carácter higroscópico.

### **6.8.1. Tamaño de la muestra**

Debido a que el objetivo de este estudio no fue realizar la validación de datos de  $\text{PM}_{10}$  de acuerdo a lo especificado en la NOM-025-SSA1-2014, el tamaño de la muestra se determinó de manera no probabilística, con una frecuencia de una toma de 24 horas cada seis días.

### **6.8.2. Preparación de los filtros para su uso**

Previo a su uso, los filtros se acondicionaron y se estabilizaron durante 48 h bajo condiciones constantes de humedad relativa y temperatura ( $47\% \pm 5\%$  y  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivamente). Se utilizó una fuente alfa de  $^{210}\text{Po}$  para eliminar la carga electrostática de los filtros durante el pesaje.

### 6.8.3. Determinación de la masa de los filtros

Una vez estabilizados, los filtros se pesaron en una balanza (Ohaus-GA 2000) con una resolución de 10 µg y se guardaron individualmente en cajas petri de plástico de 47 mm de diámetro hasta su colocación en el equipo.

Una vez concluido el periodo de exposición, los filtros se pesaron nuevamente para obtener la cantidad de PM<sub>10</sub> por gravimetría. La estabilización y el pesaje de los filtros se realizaron en el laboratorio del Dr. Javier Miranda del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFUNAM).

### 6.8.4. Digestión de los filtros y cuantificación de los metales

Cada filtro se colocó en un vaso de digestión, al cual se le adicionaron 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y se realizó la digestión en un horno de microondas (CEM, EUA) de acuerdo las condiciones que se muestran en la tabla 4. Terminada la digestión y después de haberse enfriado a temperatura ambiente, las muestras se aforaron a 50 mL con HNO<sub>3</sub> al 3%. La determinación de los metales se llevó a cabo utilizando las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica (Varian, Spectra AA-800, Australia). Los elementos analizados en los filtros fueron: Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn, las concentraciones fueron expresadas en ng m<sup>-3</sup>.

Tabla 4. Condiciones de trabajo en la digestión de filtros

Etapa	Energía		Tiempo de rampa (min)	Presión (psi)	Temperatura (°C)	Tiempo de digestión (min)
	Nivel (W)	(%)				
1	400	100	15:00	350	200	15:00

Para realizar la curva de calibración se usaron patrones analíticos de Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn de la marca Merck. Los parámetros de trabajo utilizados para cada elemento fueron descritos en la Tabla 1.

### 6.9. Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para encontrar la posible asociación entre las concentraciones de los contaminantes y los parámetros

biológicos. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, para comparar los valores promedio obtenidos de cada determinación en ambos sitios de estudio. Para los análisis anteriores se empleó el software SPSS versión 19 de la compañía SPSS Inc., Chicago, IL, USA.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Metales en *T. usneoides*

El efecto biológico de los metales depende de la capacidad que poseen los iones de cada elemento para formar complejos estables con los compuestos orgánicos de la materia viva. Iones como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  tienen la capacidad de formar ligandos. Hay macronutrientes esenciales para todas las plantas (K, Ca y Mg), nutrientes esenciales o beneficiosos solo para determinadas especies (Na para halófitas) y algunos sin función biológica conocida (Ba, Cd, Pb, entre otros). Solo las especies iónicas dañan a las plantas, porque además de interaccionar con los componentes orgánicos de las mismas, también provocan una disminución del potencial osmótico del sustrato de crecimiento. A pesar de que algunos iones ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) son micronutrientes esenciales, cuando su concentración es mayor a la requerida pueden causar estrés iónico y por lo tanto ser tóxicos. En este estudio se cuantificó la concentración de ocho elementos (Cd, Ni, Pb, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn y Ca) retenidos por el biomonitor *T. usneoides*, para determinar si alguno de ellos se correlacionaba con la expresión de los biomarcadores de efecto estudiados.

#### 7.1.1. Plomo

##### Experimento 1

En la figura 7a se puede observar que la concentración inicial de este elemento fue menor al límite de detección y que en ambos sitios de estudio aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ). También es evidente que en Tlaxcoapan fue mucho mayor la concentración cuantificada en el biomonitor ( $73.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) que en Actopan ( $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los datos anteriores confirman la utilidad que tiene *T. usneoides* como biomonitor de Pb en la atmósfera, dado el amplio rango de concentraciones en que lo puede retener. Calvario-Rivera (2012) y Martínez-Carrillo *et al.* (2010) encontraron este mismo comportamiento de *T. usneoides* con respecto al plomo.

## Experimento 2

En este experimento las concentraciones de plomo en los tejidos de *T. usneoides* siguieron tendencias de acumulación en ambos sitios de estudio. En la figura 7b se puede observar como a lo largo de la exposición se presentan aumentos significativos entre la concentración inicial y la concentración consecutiva. La concentración inicial fue de  $29.01 \text{ mg kg}^{-1}$  para ambos sitios; al término del experimento se cuantificaron  $87.95$  y  $96.91 \text{ mg kg}^{-1}$  en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente.

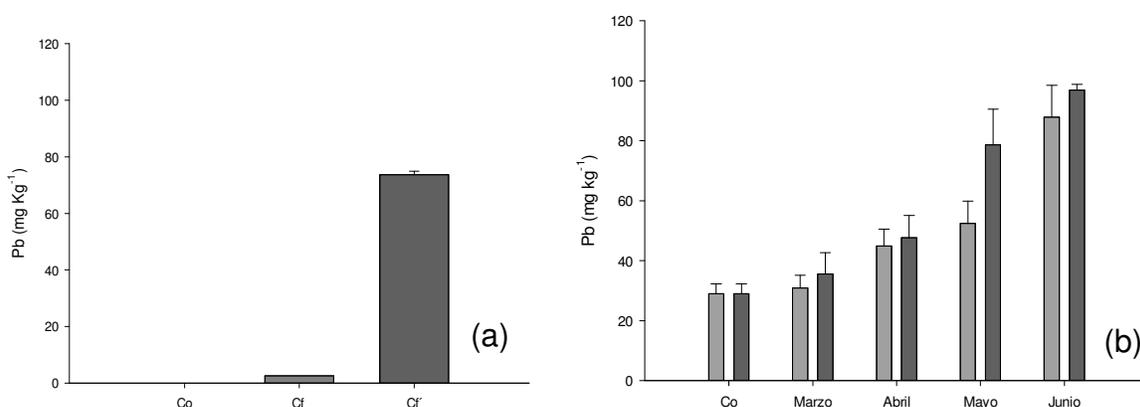


Figura 7. Concentración de Pb en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

El Pb es un elemento no esencial en los organismos y la forma de obtención para las plantas es a través del suelo y de los aerosoles atmosféricos (Odjegba *et al.*, 2007). *T. usneoides* tiene la capacidad metabólica y fisiológica de acumular este elemento, como se comprobó en los experimentos realizados en este estudio y en los resultados obtenidos por Calvario-Rivera (2012). Los dos experimentos anteriores confirman que el Pb puede emplearse como biomarcador de exposición en *T. usneoides*.

Dentro de las principales fuentes de plomo atmosférico están el tráfico vehicular, las plantas generadoras de energía eléctrica y los incineradores de residuos

(Carballeira y Fernández, 2002). En el corredor industrial TVA existe considerable tráfico vehicular y dos plantas generadoras de energía.

La presencia de plomo en el ambiente es motivo de diversos estudios alrededor del mundo, ya que genera alteraciones en el ambiente donde se encuentra presente. Para algunos lugares y en el caso de esta investigación, su procedencia causa incertidumbre; sin embargo se ha demostrado que este elemento es persistente y que el 90% del plomo presente en el ambiente fue generado en algún momento por el empleo de gasolina. Por lo tanto, es posible que su presencia en los tejidos de las plantas se deba a este factor.

Se ha estimado que alrededor de 30% del total de las emisiones de plomo en la atmósfera en el país son generadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y que, en promedio, durante la década de los ochenta se liberaron alrededor de 1500 toneladas cúbicas de plomo en la atmósfera de la Ciudad de México asociadas solo con la combustión de gasolina (Cortez-Lugo *et al.*, 2003).

Para conocer el movimiento de los contaminantes en las zonas aledañas a la Región Tula-Tepeji, la modelación de la meteorología realizada por De Foy *et al* (2007) es útil, ya que indica que los vientos en la ZMVM y en la región de Tula tienen un fuerte patrón diurno que está súper-impuesto en la variación de escala sinóptica. Bajo condiciones típicas, existen vientos débiles hacia el Valle de México desde el norte durante la noche y en las primeras horas de la mañana. En ese momento, la capa límite de mezclado es sumamente estable, lo cual conlleva al transporte de la pluma con poco mezclado vertical hacia la ZMVM. Durante el día, la capa límite de mezclado aumenta rápidamente debido a la intensa radiación solar, lo cual conlleva a mayor dilución en la vertical. Los campos de viento se encuentran aún todavía hacia el sur y hacia el este durante la temporada seca del año. Por la tarde ocurre un cambio en la dirección del viento en la ZMVM con un canal de flujo desde el sur creando con ello una zona de convergencia que se desplaza hacia el norte (hacia la región Tula-Tepeji) a través de la ciudad de México. Este cambio en la dirección del viento transporta la pluma urbana hacia el

noreste. En Tula, la pluma también es transportada hacia el este por la tarde antes del regreso de los vientos débiles de la cuenca por la noche (INE, 2009).

### **7.1.2. Cobre**

#### **Experimento 1**

La concentración inicial de cobre fue de  $52.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , y al final, en Actopan fue ligeramente superior ( $55.08 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a diferencia de Tlaxcoapan donde hubo un aumento significativo con respecto a las dos concentraciones anteriores ( $324.18 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 8a). Al igual que en el caso del Pb, es evidente que T. usneoides retiene Cu en un amplio rango de concentraciones.

#### **Experimento 2**

Las concentraciones de Cu en el biomonitor fueron muy variables, lo que puede entenderse por ser un micronutriente con diversas funciones biológicas. La concentración promedio en Actopan fue de  $98 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que la mayor fue de  $328.7 \text{ mg kg}^{-1}$  y se presentó en mayo, ambas concentraciones fueron significativamente mayores a la inicial ( $p < 0.05$ ). En Tlaxcoapan, la mayor concentración de cobre se presentó en junio ( $308.12 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y la concentración promedio fue de  $171.69 \text{ mg kg}^{-1}$ , esta última fue significativamente mayor a la correspondiente en Actopan y también a la inicial ( $p < 0.05$ ) (Figura 8b).

El cobre proviene de zonas urbanas debido a las emisiones de vehículos, la abrasión de neumáticos, las pastillas de frenos (Querol *et al.*, 2008), también forma parte de las emisiones de algunas industrias y de las zonas agrícolas por el empleo de pesticidas. Esta última fuente es importante en la zona de estudio, ya que esta región es una importante zona agrícola (Martínez-Carrillo *et al.*, 2010), en donde se utilizan cantidades considerables de pesticidas para el control de plagas. Las plantas usan el cobre en diferentes procesos metabólicos como el crecimiento y la producción de pigmentos. El cobre también actúa como cofactor de muchas enzimas como la Cu/Zn SOD (Yruela, 2005).

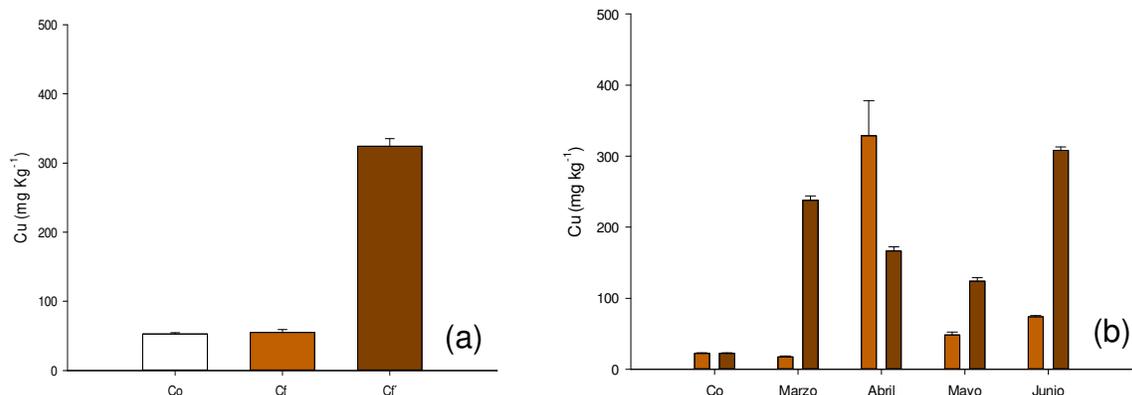


Figura 8. Concentración de Cu en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, Actopan, Tlaxcoapan.

El cobre es un micronutriente esencial para las plantas, pero se convierte en un metal tóxico cuando se encuentra en los tejidos en concentraciones más altas a las necesarias para el crecimiento vegetal ( $\approx 30 \text{ mg kg}^{-1}$ ). El cobre es capaz de promover la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en forma enzimática y no enzimática, las cuales pueden causar la oxidación de proteínas y lípidos, alterar la integridad de las membranas, la fotosíntesis, el crecimiento e inducir la muerte celular. Entre los mecanismos bioquímicos de defensa que se inducen en respuesta al daño oxidativo causado por cobre está el incremento de las actividades de enzimas antioxidantes tales como catalasa, SOD, glutatión reductasa, ascorbato y guayacol peroxidasas (León y Sepúlveda-Jiménez, 2012). En los suelos de los sitios agrícolas de la región Tula-Tepeji también se ha encontrado este elemento, y se ha relacionado con la concentración en los cultivos incluso en concentraciones mayores que las que habitualmente está presente en un cultivo (Acosta, 2007). La presencia de este elemento puede deberse a la remoción de las partículas del suelo hacia la atmósfera, las cuales pueden depositarse en el biomonitor.

### 7.1.3. Manganeso

#### Experimento 1

En este experimento se observó una ligera disminución de la concentración de manganeso en Actopan ( $589.10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Tlaxcoapan ( $595.40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) con respecto a la concentración inicial ( $609.26 \text{ mg kg}^{-1}$ ). No se presentó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de este elemento después del periodo de exposición en ninguno de los sitios de estudio (Figura 9a).

#### Experimento 2

Las concentraciones de manganeso a lo largo de la exposición se mantuvieron en un rango de  $108.30$  a  $172.51 \text{ mg kg}^{-1}$  en ambos sitios de estudio. Solo en Actopan, se mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el mes de mayo (de  $158.94 \pm 6.77 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $172.51 \pm 3.90 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Figura 9b).

El Mn es un micronutriente importante para las plantas; es un componente estructural de las proteínas del Fotosistema II y de un importante antioxidante como la SOD, que protege la estructura de las células de las plantas mediante la desactivación de los radicales libres que son capaces de destruir tejido de la planta (Roholla *et al.*, 2011). La acumulación del manganeso en las plantas tiende a disminuir por la asimilación del magnesio y calcio en el organismo (Roholla *et al.*, 2011), los cuales fueron mayoritarios en los tejidos del biomonitor.

Las concentraciones de Mn excesivas en los tejidos vegetales pueden alterar diversos procesos, tales como la actividad enzimática, la absorción, la translocación y la utilización de otros elementos minerales (Ca, Mg, Fe y P), lo que causa estrés oxidativo. El umbral de lesión Mn, así como la tolerancia a un exceso de este metal, es altamente dependiente de las especies de plantas y cultivares o genotipos dentro de una especie. Como un cofactor de la SOD, el manganeso participa en la defensa de la planta contra el estrés oxidativo producido por niveles elevados de formas activadas de los radicales de oxígeno libres y especies reactivas de oxígeno, que son perjudiciales para las plantas. Se ha propuesto que el Mn puede actuar como un eliminador de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y peróxido de

hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Sin embargo, este mecanismo todavía no está claro (Millaleo *et al.*, 2010).

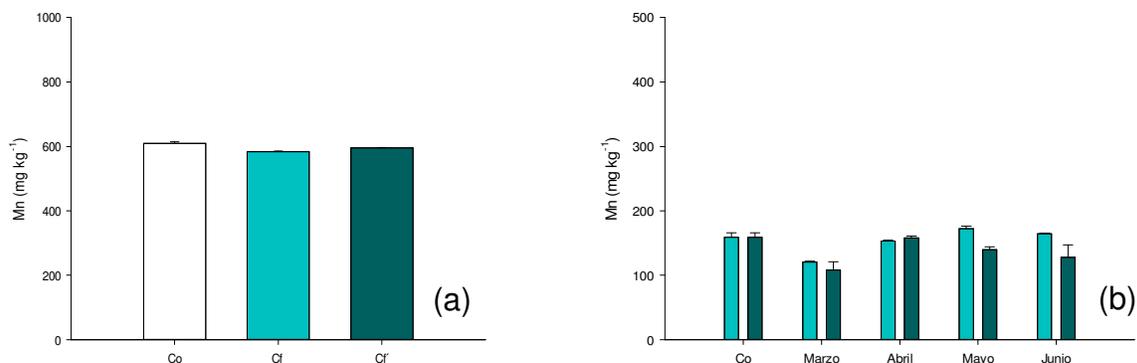


Figura 9. Concentración de Mn en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, Actopan, Tlaxcoapan.

Después de la exposición de ocho semanas las muestras de *T. usneoides* fueron recogidas (incluyeron un grupo control y 10 sitios con tráfico vehicular y establecimiento industrial) para determinar su composición elemental. Figueiredo (2007) y su equipo de investigación encontraron concentraciones de Mn en el sitio control de  $244 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$  y un rango de  $153 \pm 5$  a  $233 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$ . Estas concentraciones son muy similares a las encontradas en ambos sitios de estudio y en ambos experimentos.

#### 7.1.4. Zinc

##### Experimento 1

Durante este experimento el biomonitor presentó concentraciones de  $36.73 \pm 3.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  y  $85.79 \pm 3.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente. Para Tlaxcoapan esta concentración es significativamente mayor con respecto a la concentración al inicio del biomonitoreo ( $28.13 \pm 0.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) (Figura 10a).

##### Experimento 2

En ambos sitios de estudio este elemento se encontró en mayor concentración después del mes de abril. En el sitio Actopan la mayor concentración fue de

318.30±14.41 mg kg<sup>-1</sup> y de 303.58±4.47 mg kg<sup>-1</sup> en Tlaxcoapan. El promedio en Actopan fue de 164.39 ±90.78 mg kg<sup>-1</sup> y el del sitio Tlaxcoapan de 178.85±71.34 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 10b).

La presencia de este metal en la región industrial de Tula-Tepeji puede atribuirse a emisiones por vehículos de motor e industrias de fundición metálica. Además de que se encuentra principalmente en las áreas de mayor desarrollo de la agricultura, es un elemento requerido para diversas funciones enzimáticas en las plantas. Una baja concentración de este elemento puede atribuirse al antagonismo que existe con el hierro (Sánchez, 2005).

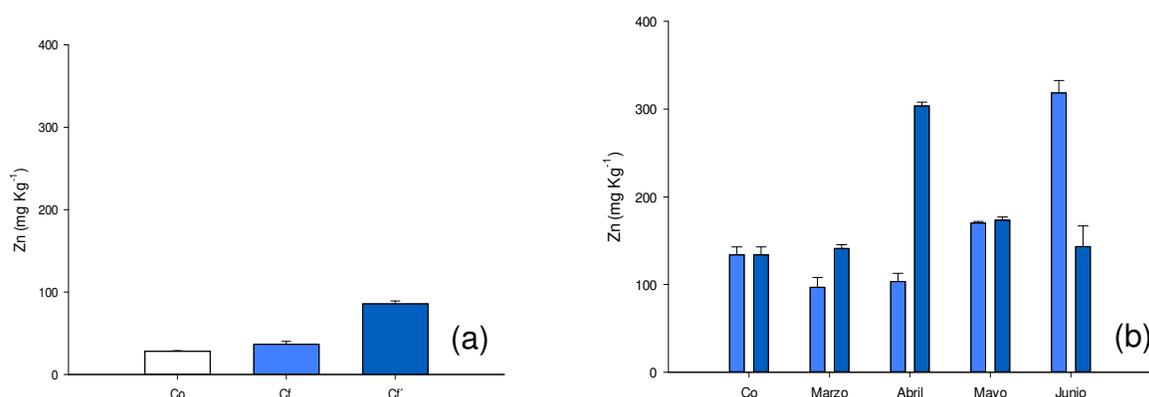


Figura 10. Concentración de Zn en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

Pellegrini *et al.* (2014) evaluaron la capacidad que tiene *T. usneoides* para acumular elementos como: Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Sr, V y Zn. Estos autores encontraron que el zinc fue uno de los elementos mayoritarios en las zonas urbanas y suburbanas. Dentro de su experimentación, consideraron evaluar los metales lavando la muestra obtenida y también a analizarla sin este procedimiento, obteniendo concentraciones de 144±41 mg kg<sup>-1</sup> y 155±46 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. También se obtuvo que en el sitio de estudio denominado industrial, la concentración promedio de zinc fue de 167±22 mg kg<sup>-1</sup> y en el sitio rural fue de 101±12 mg kg<sup>-1</sup>. Estas concentraciones

son similares a las que se presentan en este trabajo en los dos diferentes experimentos.

### **7.1.5. Magnesio**

#### **Experimento 1**

La concentración de magnesio de la planta es significativamente mayor al final de la exposición en ambos sitios. Metales pesados como el magnesio son de fácil absorción para las plantas y su influencia incluye también alteraciones como la competencia con otros nutrientes (Hecht *et al.*, 1987) (Figura 11a).

#### **Experimento 2**

Aparte del calcio, la concentración de magnesio fue una de las más elevadas con respecto al resto de los elementos estudiados. En ambos sitios el magnesio presentó concentraciones similares a lo largo de la exposición; sin embargo cabe resaltar que en Actopan la mayor concentración de magnesio se mostró en el mes de junio, esta concentración equivale al 9.86% más, que al estado inicial y en Tlaxcoapan este aumento fue de 10.67% con respecto al estado inicial (Figura 11b).

En las plantas, el magnesio es constituyente esencial de la clorofila, un activador de más de 300 enzimas (Bose *et al.*, 2011). Desempeña un papel importante en los procesos fisiológicos y bioquímicos que afectan el desarrollo y crecimiento de las plantas. Aun cuando este elemento es parte esencial de la fotosíntesis, cantidades excedentes de magnesio en la planta podrían inhibir este proceso y el crecimiento, particularmente durante la deshidratación de la planta. La deficiencia de magnesio también afecta la exportación de los carbohidratos, presumiblemente debido a la inhibición de la  $Mg^{2+}$ -protón-ATPasa.

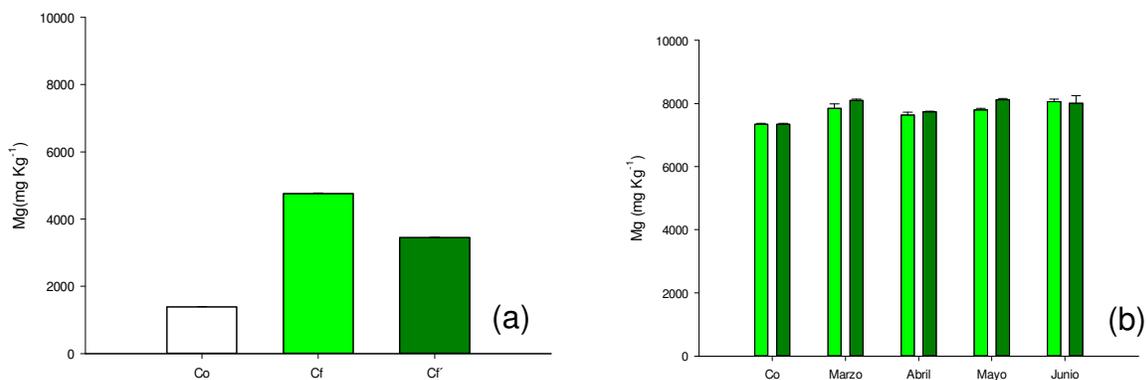


Figura 11. Concentración de Mg en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

### 7.1.6. Calcio

#### Experimento 1

El calcio es un nutriente esencial para las plantas. Es necesario para varias funciones estructurales de la pared celular y las membranas, y es un mensajero intracelular en la coordinación de las respuestas a las numerosas señales de desarrollo y estrés ambiental.

El calcio es el elemento que mayor acumulación tuvo en el biomonitor (Figura 8), en Tlaxcoapan mostró una acumulación 3 veces mayor a la del estado inicial; también presenta una diferencia significativa entre Co y los sitios de exposición, y entre el sitio control y el sitio problema. Esta acumulación elevada puede deberse a que la planta se encontró en estrés y la acumulación de este elemento contribuyó a disminuir su impacto a nivel celular (Figura 12a).

#### Experimento 2

La absorción del calcio por la planta es pasiva y no requiere una fuente de energía. El calcio se transporta por la planta principalmente a través del xilema, junto con el agua. Por lo tanto, la absorción del calcio, está directamente relacionada con la proporción de transpiración de la planta.

En este experimento, se observó que la mayor acumulación de este elemento se presentó en el mes de mayo. En el sitio Actopan, de una concentración inicial de  $504.01 \pm 26.3 \text{ mg kg}^{-1}$  aumentó a  $2846.59 \pm 124.6 \text{ mg kg}^{-1}$  en el mes de mayo, es decir 5.6 veces más su concentración inicial. Por otra parte, en Tlaxcoapan la concentración acumulada del biomonitor fue de  $504.01 \pm 26.3 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $6919.18 \pm 4.89 \text{ mg kg}^{-1}$  (3.7 veces mayor al estado inicial y 2.5 veces mayor que en Actopan). En ambos sitios el aumento de las concentraciones de calcio fue significativo ( $p < 0.05$ ) (Figura 12b).

Calvario-Rivera (2012), también realizó un biomonitoreo activo con *T. usneoides* en Tlaxcoapan, en dos estaciones del año, y también encontró que la planta tiene la capacidad de acumular calcio en sus tejidos. Las concentraciones de calcio en la época de estiaje fueron de  $17705 \pm 1958 \text{ mg kg}^{-1}$  y en la época de lluvia de  $4122 \pm 261 \text{ mg kg}^{-1}$  este último valor es similar a la concentración que se obtuvo en este estudio.

El calcio es muy abundante en el entorno natural en el que crecen la mayoría de las plantas, y estas lo toman para producir cristales de oxalato de calcio, elemento necesario para su crecimiento y desarrollo. El calcio es un componente estructural de las paredes celulares además de que es un activador en varias vías fisiológicas y de desarrollo. La mayoría de las plantas, a diferencia de los animales, no tienen sistemas excretores bien desarrollados para eliminar el exceso de calcio. En cambio, las plantas superiores regulan la distribución de calcio dentro de las células. La pared celular y la vacuola representan grandes sumideros de calcio en las plantas (Kinzel, 1989). Ya que *T. usneoides* es considerada una planta superior, tiene por lo tanto la capacidad de almacenar grandes cantidades de Ca presente en la atmósfera de los sitios de estudio. Existen registros de seis empresas que explotan el recurso natural denominado caliza (roca compuesta mayoritariamente por carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), las estadísticas reportan que al día se extraen 21,050 toneladas  $\text{CaCO}_3$  (Servicio Geológico Mexicano, 2014). Esta actividad se realiza al aire libre y genera emisiones fugitivas que sobrecargan al aire de la atmósfera del elemento Ca.

Zambrano *et al.* durante el 2009 realizaron un biomonitoreo pasivo en la región del Valle del Mezquital donde los muestreos de *T. recurvata* como biomonitor incluyeron la región Tula-Tepeji. Como resultado obtuvieron que este biomonitor fue capaz de acumular calcio en sus tejidos, y la concentración promedio de este elemento fue de 12556 mg Kg<sup>-1</sup> y un rango de concentración entre muestras de 2883-46780 mg Kg<sup>-1</sup>. En este estudio el valor encontrado fue de 3634± 301 mg Kg<sup>-1</sup> y 4768±197 mg Kg<sup>-1</sup> en Actopan y Tlaxcoapan respectivamente. Las concentraciones obtenidas en Tlaxcoapan en este estudio se encuentran dentro del rango que obtuvo Zambrano *et al.* (2009). Hay que considerar que en este estudio se realizó un muestreo activo con *T. usneoides* sin embargo la información no es diferente.

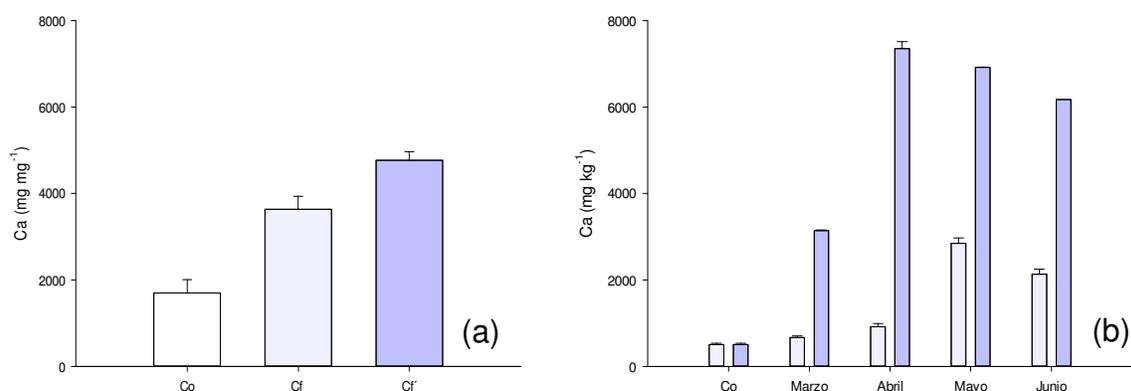


Figura 12. Concentración de Ca en el biomonitor a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

### 7.1.7. Hierro

#### Experimento 1

En este experimento la concentración inicial de hierro fue de 1014.15±114.15 mg kg<sup>-1</sup>. Después de la exposición en Actopan se mostró un ligero aumento (1100.86±72.86 mg kg<sup>-1</sup>) mientras que en Tlaxcoapan se observó un decremento después de la exposición (921.74±7.18 mg kg<sup>-1</sup>). Estas concentraciones no representan una diferencia significativa después la exposición (Figura 13a).

## Experimento 2

En Actopan, durante el segundo experimento, en ambos sitios el hierro presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ). En el sitio Tlaxcoapan, se observó una disminución del 15.88% y no fue hasta el mes de junio que se observó un aumento de 6.45%. Esta concentración fue la más alta obtenida en los sitios de estudio (Figura 13b).

El hierro es un importante constituyente del grupo hemo de enzimas como la catalasa, citocromo oxidasa y POD, siendo esta última una enzima que disminuye el daño oxidativo en algunas plantas. Calvario-Rivera (2012) encontró concentraciones promedio de  $928 \pm 333 \text{ mg kg}^{-1}$  de hierro en *T. usneoides* en el mismo sitio de estudio, concentración similar a la del primer experimento, ya que en el segundo experimento las concentraciones llegan hasta ser 2.5 veces mayores. La industrias de cemento y cal asentadas en la región industrial Tula-Tepeji, son las principales fuentes de emisión a las cuales se les atribuye la presencia de hierro en el material particulado; así como las industrias fundidoras de hierro y acero, los vehículos de motores y la combustión del carbón (Sánchez, 2005), industrias presentes en el área de estudio.

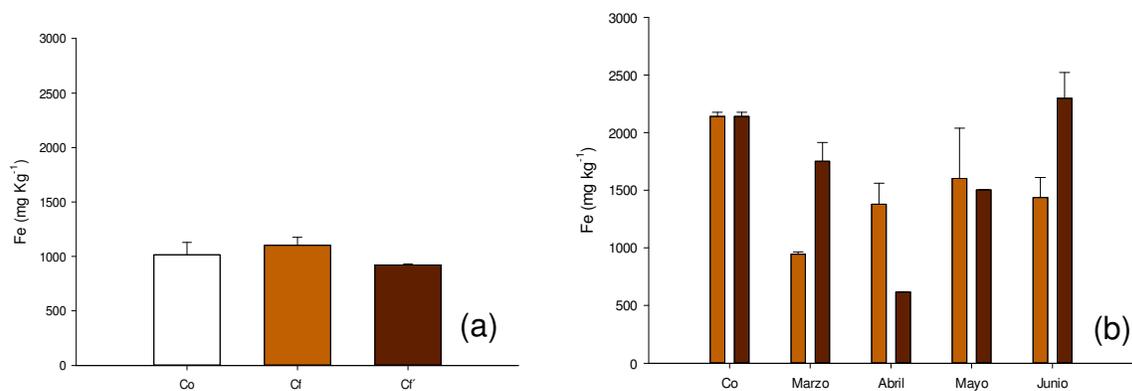


Figura 13. Concentración de Fe en el biomonitor. a) Experimento 1. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente; b) Experimento 2. Co: concentración inicial, Actopan, Tlaxcoapan.

### 7.1.8. Níquel y Cadmio

El cadmio es un elemento no esencial para las plantas, mientras que el níquel es un micronutriente esencial para las plantas superiores, se requiere en concentraciones tan bajas que es tóxico en exceso (Yang, *et al.*, 1996). Estos elementos están presentes en el ambiente ya que son emitidos por fuentes como la industria minera, las centrales térmicas o bien por la combustión de hidrocarburos y carbón además de las emisiones generadas por los automóviles (Owega *et al.*, 2003). Se generan también como un subproducto de la minería, fundición y refinación de minerales de sulfuro de zinc, y en menor grado del sulfuro de plomo y sulfuro de cobre; incluso las baterías contienen una mezcla de estos dos elementos. ([http://www.who.int/ifcs/documents/forum/forum5/nmr\\_cadmium.pdf](http://www.who.int/ifcs/documents/forum/forum5/nmr_cadmium.pdf)).

Dentro de la biosfera, el cadmio se transloca por diferentes procesos. Las principales fuentes de emisiones a la atmósfera a partir de fuentes naturales son los volcanes, las partículas del suelo suspendidas en el aire, la espuma del mar, material biogénico y los incendios forestales. Las emisiones totales a la atmósfera a partir de fuentes naturales se estiman en alrededor de 150-2,600 toneladas. ([http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr\\_cadmium.pdf](http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf)).

Se conoce que en algunas plantas la presencia de este elemento en sus tejidos disminuye significativamente el contenido de clorofila con el aumento de la concentración de cadmio, así como la actividad NR y el contenido de proteínas (Garg *et al.*, 1997). Sin embargo Calvario-Rivera (2012) reporta concentraciones de Cd en los tejidos de *T. usneoides* por debajo del límite de detección ( $2.8 \times 10^{-3}$  mg kg<sup>-1</sup> de peso seco) en ambos periodos en que llevó a cabo su estudio (época de estiaje y época de lluvia). Y Wansoh *et al.*, 2014 también reporta que *T. usneoides* no es capaz de acumular Cd en sus tejidos.

El níquel en forma natural se encuentra en las rocas volcánicas (García y Azcona, 2012), es el componente funcional de ciertas enzimas además de ser extremadamente importante para el metabolismo de N en las plantas (López y

Magnitskiy, 2011). Sin embargo el exceso de este elemento puede afectar procesos fisiológicos/bioquímicos como lo es la disminución del contenido de la clorofila y las actividades fotosintéticas y de transpiración además de alterar la permeabilidad de la membrana asociada con una mayor actividad de la POD extracelular (Yang, *et al.*, 1996).

Calvario-Rivera (2012), empleando *T. usneoides*, reporta dinámicas con tendencias descendentes de níquel en época de estiaje. Observó concentraciones de 1.23 a 5.50 mg kg<sup>-1</sup> en peso seco al final del periodo de exposición en los sitios estudiados. Este rango es similar a las concentraciones que reportan Zambrano *et al.* (2010) (1.6-44.2 mg kg<sup>-1</sup> de Ni en peso seco) en *T recurvata*.

La influencia de industrias asentadas en la Región Tula-Tepeji es capaz de propiciar la presencia de estos elementos en la atmósfera de la zona de estudio (en Tlaxcoapan). Sin embargo, la capacidad del biomonitor para acumular este elemento no fue reflejada en este estudio, ya que la concentración de níquel y cadmio fue menor al límite de detección del equipo empleado para su determinación. La concentración mínima que detecta el equipo es <0.001 y <0.002 para níquel y cadmio, respectivamente.

## **7.2. Biomarcadores**

### **7.2.1. Clorofilas y relación clorofila a/b**

#### **Experimento 1**

En ambos sitios de estudio se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la producción de clorofila *a* al final del experimento. En el sitio control (Actopan) el incremento fue del 39%, mientras que en el sitio receptor (Tlaxcoapan) fue del 15% (Figura 14). El contenido final de clorofila *b* también fue significativamente mayor en ambos sitios, 31% en Actopan y 19% en Tlaxcoapan ( $p < 0.05$ , Figura 15). El mayor incremento se presentó en la clorofila total (43% en Actopan y 20% en Tlaxcoapan) (Tabla 5).

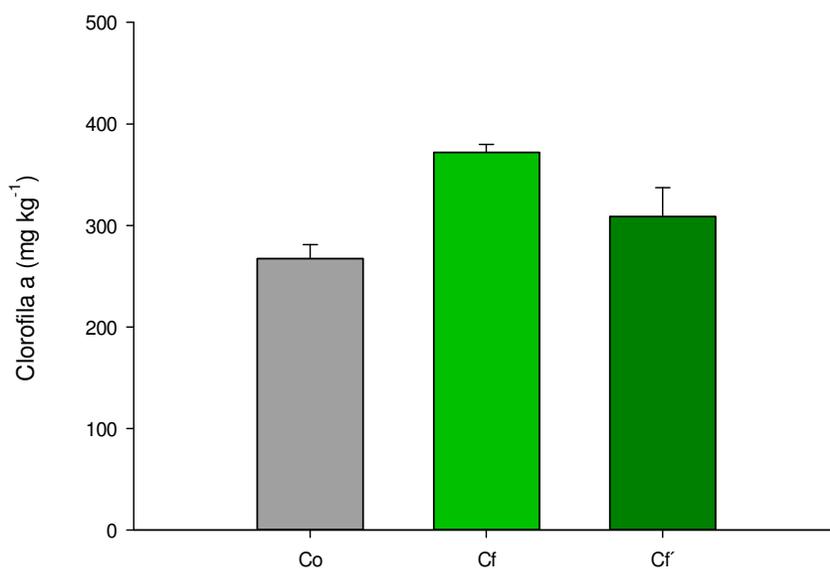


Figura 14. Concentración de clorofila *a* en el biomonitor en el experimento 1. ■ Co: concentración inicial (febrero), Cf y Cf': concentración al final de la exposición (octubre) en ■ Actopan y ■ Tlaxcoapan, respectivamente.

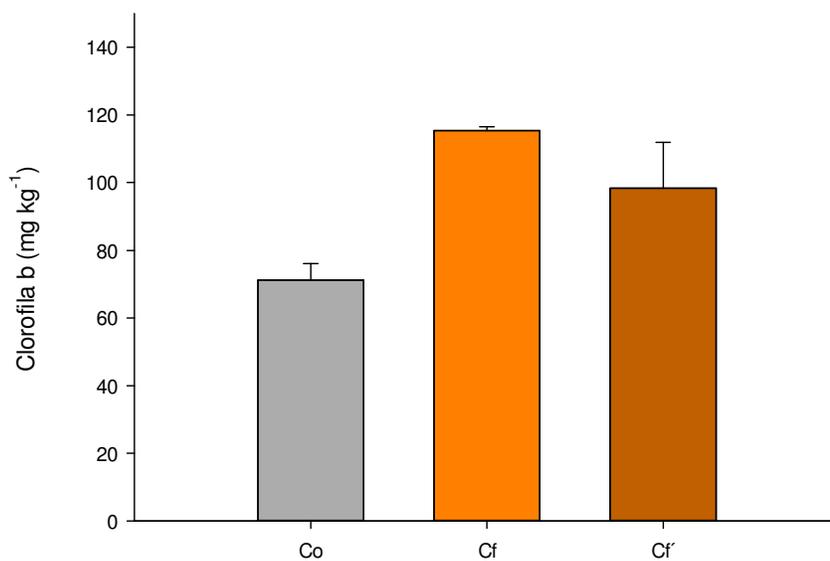


Figura 15. Concentración de clorofila *b* en el biomonitor en el experimento 1. ■ Co: concentración inicial (febrero), Cf: concentración al final de la exposición (octubre) en ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan

Tabla 5. Concentración de clorofila total ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y relación clorofila a/b en el biomonitor en el experimento 1.

Exposición	Clorofila total	Clorofila a/b
<b>Co</b>	338.79	3.75
<b>Cf<sub>Actopan</sub></b>	487.31	3.22
<b>Cf<sub>Tlaxcoapan</sub></b>	407.10	3.13

Co: concentración inicial (febrero), Cf: concentración al final de la exposición (8 meses), Actopan: sitio control, Tlaxcoapan: sitio problema

El aumento que se presentó en la producción de clorofilas puede explicarse por el acondicionamiento que se les dio a las plantas antes de la exposición y por la forma en que fueron expuestas. Como se mencionó en el apartado 6.2, las plantas se colectaron en Buena Vista, Hgo.; que es una comunidad rural con vialidades no pavimentadas. Por esta razón las plantas se encontraban cubiertas de polvo. En diversos estudios se ha comprobado que el polvo interfiere con el proceso de fotosíntesis mediante dos vías. La primera es por la reducción de la luz incidente, debido al efecto de sombra que generan las partículas sobre la superficie de la planta y la segunda es por la alteración del proceso de difusión, debido a que algunas de partículas de polvo penetran en la cera epicuticular y provocan el cierre de estomas con la consecuente acumulación de  $\text{CO}_2$  en las cavidades subestomáticas (Thawale *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 1984). Antes de su exposición las plantas se lavaron con agua corriente, precisamente para eliminar las partículas de polvo, como se comentó en la metodología (§ 6.3), con lo que se eliminó el efecto de sombra y muy probablemente se mejoró el proceso de difusión. Por otra parte, la forma de exponer las plantas también favoreció la actividad fotosintética, ya que en los árboles, de manera natural, *T. usneoides* crece semiprotegida de la luz solar. En cambio, en el experimento la planta completa estaba expuesta a la luz del sol (Figura 23, Anexo). La cantidad de radiación solar que recibe una planta es un factor determinante en su actividad fotosintética; incluso, en una misma planta las partes más expuestas a la luz solar tienen una tasa fotosintética mayor que las que están en semisombra (Azcón-Bieto *et al.*, 2003).

Por la diferencia observada en las concentraciones de clorofilas *a* y *b* en los sitios de estudio, podría pensarse que el biomonitor expuesto en Tlaxcoapan experimentó algún tipo de estrés que afectó su actividad fotosintética. Dado que las condiciones climáticas son similares en ambos sitios, se descartaron como un factor que pudiera explicar estas diferencias. Por otra parte, se sabe que algunos contaminantes, como los metales, pueden alterar la fotosíntesis (Shaw *et al.*, 2004; Dazy *et al.*, 2009). De los metales evaluados en este experimento, las concentraciones finales de Ca, Cu, Pb y Zn en el biomonitor expuesto en Tlaxcoapan fueron significativamente mayores que las iniciales y las encontradas en Actopan, lo que podría sugerir un posible efecto adverso de estos metales sobre la fotosíntesis. Sin embargo, el análisis de correlaciones de Pearson no apoyó esta idea, ya que las correlaciones encontradas entre los metales antes mencionados y las clorofilas fueron positivas (Anexo 3, tabla 10 y 11). Únicamente se encontraron correlaciones negativas de la clorofila *b* con el Fe ( $r = -0.980$ ,  $p < 0.01$ ) y con el Mn ( $r = -0.940$ ,  $p < 0.01$ ), ambos micronutrientes, con concentraciones similares en los biomonitores de ambos sitios.

A diferencia de las concentraciones de clorofila, la relación entre las clorofilas *a* y *b* fue menor al final del experimento en ambos sitios de estudio (Tabla 4). Es probable que la clorofila *b* haya aumentado en menor proporción que la clorofila *a* debido al papel protector contra la oxidación que tiene la primera (Shafiqur *et al.*, 2000).

## **Experimento 2**

En ambos sitios de estudio la clorofila *a* presentó un comportamiento de campana muy suave, sin embargo, al final el descenso sí fue notorio y significativo ( $p < 0.05$ , Figura 12). En Actopan el mayor aumento se presentó en abril ( $305.62 \pm 15.57 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y en Tlaxcoapan, en mayo ( $324.57 \pm 10.77 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en ambos casos el incremento fue significativo ( $p < 0.05$ ). En los dos sitios, la menor concentración ( $p < 0.05$ ) se presentó en junio, el último mes del experimento.

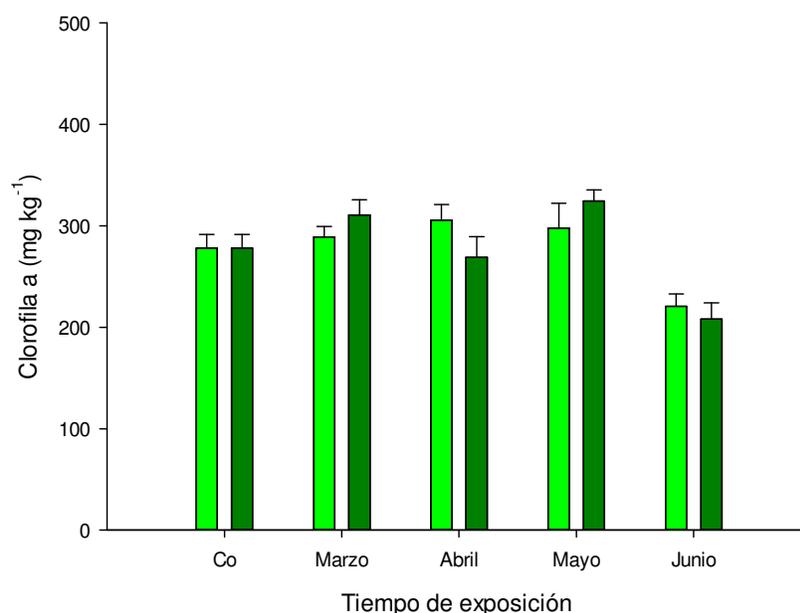


Figura 16. Concentración de clorofila *a* en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan y ■ Tlaxcoapan.

En la figura 17 se observa que el comportamiento de la clorofila *b* en el biomonitor fue muy similar al de la clorofila *a*. En abril se detectó la concentración más elevada ( $95.57 \pm 6.52 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ) en Actopan y en mayo en Tlaxcoapan ( $92.95 \pm 2.31 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). Ambas concentraciones fueron estadísticamente iguales. La concentración final fue significativamente menor a las demás en los dos sitios ( $p < 0.05$ ).

Durante el experimento la concentración total de clorofila en el biomonitor mostró el mismo comportamiento que las clorofilas *a* y *b*, es decir, aumentó significativamente de febrero a mayo y en junio disminuyó por debajo del valor inicial ( $p < 0.05$ ) (Tabla 6).

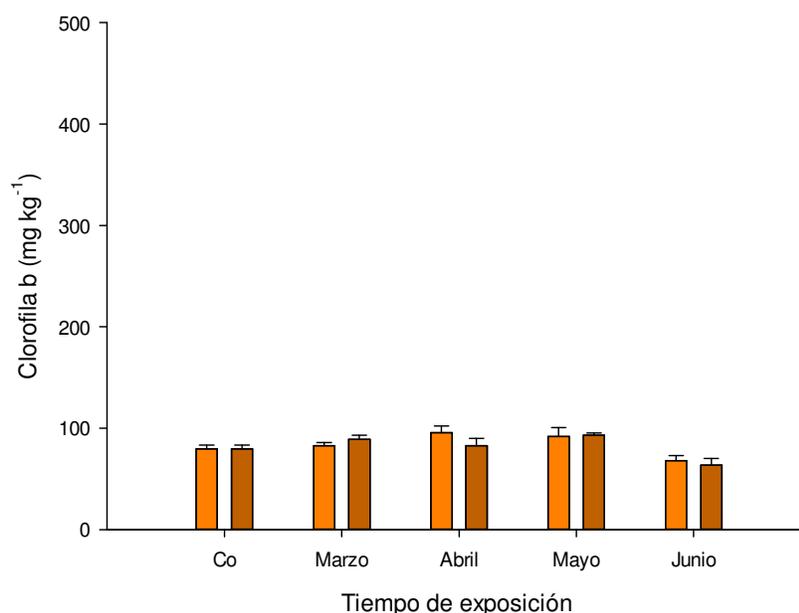


Figura 17. Concentración de clorofila *b* en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial (febrero), ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

En este experimento la relación entre las clorofilas *a* y *b* se comportó de manera similar en ambos sitios. Durante febrero y marzo se mantuvo constante y en los siguientes tres meses disminuyó ligeramente (Tabla 9).

Tabla 6. Concentración de clorofila total ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y relación clorofila *a/b* en el biomonitor durante el experimento 2.

Exposición	Clorofila total	Clorofila total	Clorofila <i>a/b</i>	Clorofila <i>a/b</i>
	Actopan	Tlaxcoapan	Actopan	Tlaxcoapan
<b>Febrero</b>	357.42	357.42	3.49	3.49
<b>Marzo</b>	371.55	399.95	3.49	3.49
<b>Abril</b>	401.19	351.58	3.20	3.25
<b>Mayo</b>	389.57	417.52	3.24	3.49
<b>Junio</b>	288.75	271.61	3.24	3.27

El incremento inicial que se observó en las clorofilas (*a*, *b* y total) puede atribuirse, como en el experimento anterior, al precondicionamiento de las muestras y a la forma de exposición. La disminución que se presentó en junio podría explicarse por la acumulación progresiva de partículas de polvo sobre el biomonitor, así como por un posible efecto tóxico del Pb y Ca que acumuló de forma paulatina el

biomonitor durante el experimento, como se observó en las figuras 7 y 12. En Hidalgo, durante marzo y abril, se preparan las camas de siembra para los cultivos de temporal y de riego, lo que provoca un incremento en el material particulado atmosférico. De igual manera, los meses en que no llueve es cuando se realizan las actividades de excavación y extracción en las industrias cementeras y caleras. Posiblemente, de haber contado con muestras viables del biomonitor, se habría observado una recuperación de la actividad fotosintética durante la temporada de lluvia.

Al igual que en el primer experimento, el descenso en la producción de clorofilas fue mayor en Tlaxcoapan que en Actopan, lo cual coincide también con la mayor acumulación de Pb y Ca en el biomonitor. De acuerdo con el análisis de correlación de Pearson, en Tlaxcoapan la producción de clorofila *a* se afectó negativamente por el incremento de Cu y Fe en el biomonitor y Pb en PM<sub>10</sub> ( $r = -0.561$ ,  $-0.418$  y  $-0.477$ , respectivamente,  $p \leq 0.01$ ). Por su parte, el contenido de clorofila *b* también se correlacionó negativamente con el Pb en PM<sub>10</sub> y con el Cu en el biomonitor ( $r = -0.527$  y  $-0.468$ , respectivamente,  $p \leq 0.01$ ). La única correlación positiva que se encontró fue entre la clorofila *b* y el contenido de Zn en el biomonitor ( $r = -0.432$ ,  $p \leq 0.05$ ). En Actopan se encontraron correlaciones negativas entre la producción de clorofila *a* y la concentración de Ca en el biomonitor y de NO<sub>2</sub> en PM<sub>10</sub> ( $r = -0.437$  y  $-0.368$ , respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). La clorofila *b* también presentó una correlación negativa con el NO<sub>2</sub> en PM<sub>10</sub> ( $r = -0.378$ ,  $p \leq 0.05$ ) y correlaciones positivas con el contenido de Cu y Zn en el biomonitor ( $r = 0.505$  y  $0.467$ ,  $p \leq 0.01$ ) (anexo 3, tabla 12 y 13). Los datos anteriores coinciden con los hallazgos reportados por varios investigadores acerca del efecto de los metales (Shaw *et al.*, 2004; Dazy *et al.*, 2009) y el NO<sub>2</sub> (Wiese y Pell, 2004) sobre la producción de clorofilas.

## 7.2.2. Proteínas totales

### Experimento 1

En este experimento el contenido de proteínas disminuyó prácticamente en la misma proporción en ambos sitios (17% en Actopan y 16% en Tlaxcoapan) (Figura 18). Algunos contaminantes, como los metales, pueden provocar un mal plegamiento de las estructuras de las proteínas, o bien inducir la formación de especies reactivas de oxígeno, que a su vez provocan la desnaturalización de las proteínas (Shaw *et al.*, 2004). En Actopan se encontró una correlación negativa entre el contenido de proteínas y las concentraciones de Pb, Mg y Ca en el biomonitor ( $r = -0.814$ ,  $-0.817$  y  $-0.869$ , respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). En Tlaxcoapan las correlaciones encontradas entre la concentración de proteínas y los metales anteriores presentaron valores de  $r$  entre  $-0.745$  y  $-0.759$ ; sin embargo, no fueron significativas. Con base en los datos anteriores, podría pensarse que el Pb, Mg y Ca afectaron directa o indirectamente la producción de proteínas. Cabe mencionar que Ca y Mg actúan como cofactores de algunas proteínas con actividad enzimática (Goday y Pagés, 2004). Sin embargo, la correlación negativa que presentaron con las proteínas en este trabajo pudo deberse a las concentraciones tan elevadas en que se encontraron estos metales en el biomonitor.

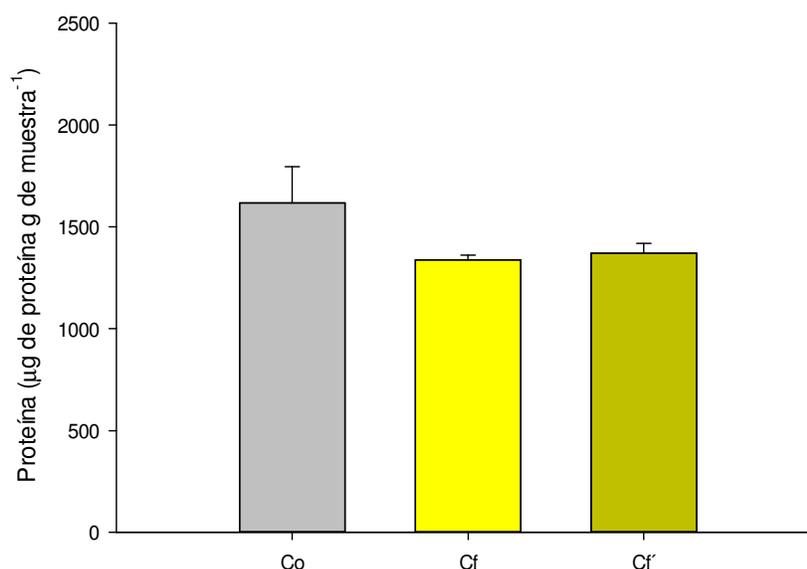


Figura 18. Concentración de proteína en el biomonitor durante el experimento 1. ■ Co: concentración inicial, ■ Cf: concentración al final de la exposición en Actopan, ■ Cf' concentración al final de la exposición en Tlaxcoapan.

## Experimento 2

En Actopan, la concentración de proteínas presentó variaciones importantes y significativas ( $p < 0.05$ ). Primero disminuyó 60.08% en marzo; en los siguientes dos meses aumentó hasta recuperar el valor inicial y en junio volvió a disminuir un 26.6% con respecto al contenido inicial (Figura 19). En Tlaxcoapan las mayores variaciones se presentaron en los dos últimos meses. En mayo disminuyó 15.71% ( $p < .005$ ) con respecto al contenido inicial y en junio se recuperó en la misma proporción (Figura 19). Como se mencionó anteriormente, algunos metales como Na, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn pueden actuar como cofactores enzimáticos, lo que puede explicar las correlaciones positivas que se encontraron entre el contenido de proteína y las concentraciones de Fe, Zn y Cu en el biomonitor ( $r = 0.601$ ,  $0.467$  y  $0.462$ , respectivamente,  $p < 0.01$ ) en Actopan. En Tlaxcoapan también se observaron correlaciones positivas entre los contenidos de proteína y los de Cu en el biomonitor y en  $PM_{10}$  ( $r = 0.546$ ,  $p < 0.01$  y  $r = 0.472$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) y de Mg en  $PM_{10}$  ( $r = 0.511$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, en este sitio también se encontró que los contenidos de proteína disminuyeron cuando aumentaron los de

Pb y Zn en el biomonitor y de Ca en PM<sub>10</sub> ( $r = 0.496$ ,  $0.595$  y  $0.493$ , respectivamente). Como se discutió en el apartado 7.1, los contenidos de estos tres metales fueron mayores en Tlaxcoapan, lo que explicaría un posible efecto adverso sobre la producción de proteínas.

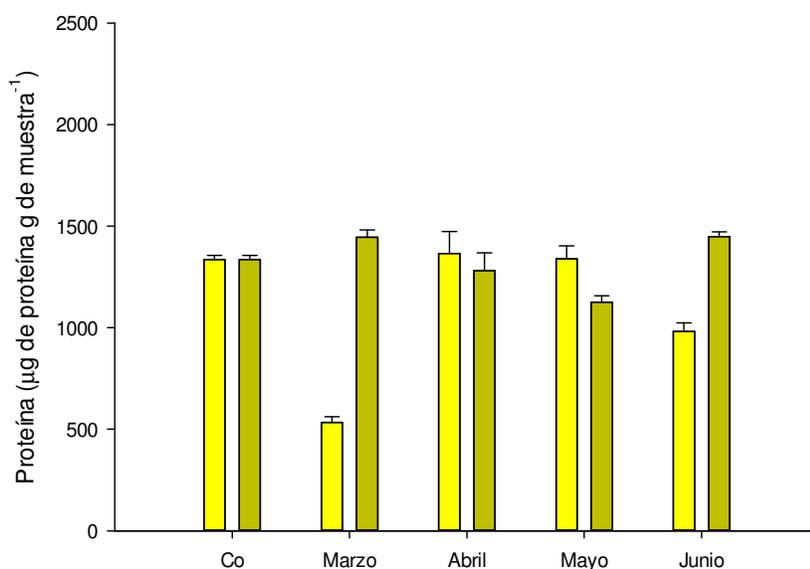


Figura 19. Concentración de proteína en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

La producción de proteínas es uno de los aspectos fisiológicos más importantes en las plantas, no solo en relación al crecimiento, sino también en cuanto a la respuesta a estresores se refiere. Por un lado, las plantas cuentan con mecanismos de defensa y de reparación para contrarrestar los efectos que causan diferentes tipos de estrés. Entre estos mecanismos están las proteínas chaperonas, cuya función es evitar y reparar el mal plegamiento de otras proteínas. Sin embargo, cuando una proteína ha sido dañada irreparablemente se induce la formación de proteasas, cuya función es degradar esas proteínas dañadas para aumentar la disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas (Goday y Pagés, 2004). Es probable que la combinación de todos estos procesos (crecimiento, prevención, reparación y supervivencia) hayan contribuido a las variaciones que se observaron en el contenido de proteína en los biomonitores expuestos en este estudio.

### 7.2.3. Actividad peroxidasa (POD)

#### Experimento 1

En Actopan, la actividad POD no presentó cambios significativos ( $2.22 \pm 1.30 \mu\text{mol min g de muestra}^{-1}$ ) con respecto a la actividad inicial ( $2.35 \mu\text{mol min g de muestra}^{-1}$ ). En Tlaxcoapan, por el contrario, esta actividad fue seis veces mayor ( $12.98 \mu\text{mol min g de muestra}^{-1}$ ) y significativamente diferente con respecto a la inicial y a la de Actopan ( $p < 0.05$ , 20). Las POD, junto con la SOD y la ferritina, son los antioxidantes primarios que protegen a los organismos del estrés oxidativo. Entre los contaminantes atmosféricos que pueden causar este tipo de estrés se encuentran los  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{O}_3$  y metales (Pukacka y Pukacki, 2000).

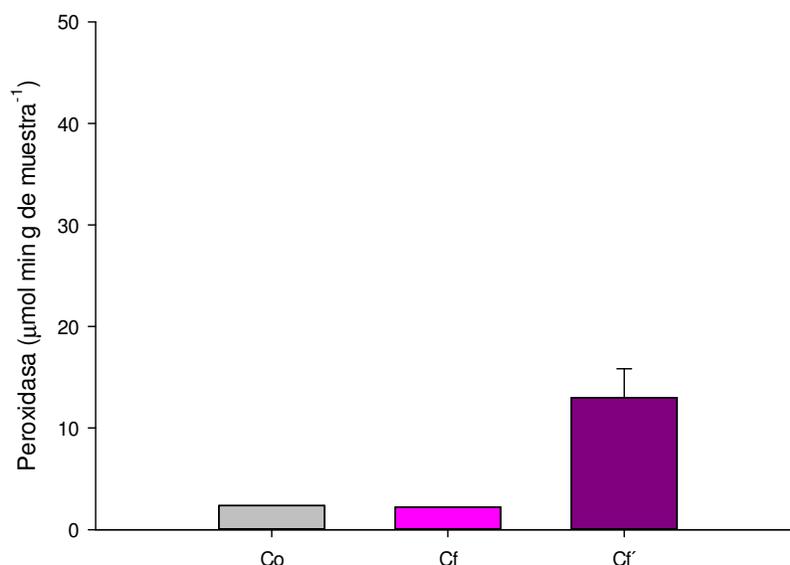


Figura 20. Actividad POD en el biomonitor durante el experimento 1. ■ Co: concentración inicial (febrero), Cf y Cf': concentración al final de la exposición (octubre) en ■ Actopan y ■ Tlaxcoapan, respectivamente.

El incremento de la actividad POD en Tlaxcoapan se correlacionó positivamente con los contenidos de Ca, Cu, Mg, Pb y Zn en el biomonitor ( $0.738 \leq r \leq 0.764$ ). Sin embargo, estas correlaciones no resultaron significativas. La única correlación significativa que se encontró fue con la actividad SOD ( $r = -0.911$ ,  $p < 0.05$ ). Los datos anteriores indican que el incremento de los metales antes mencionados en

el biomonitor representa un factor estresante que incentiva la actividad POD, pero no así la actividad SOD. Esto último se discutirá más adelante.

## Experimento 2

Se observó en ambos sitios que la actividad POD tendió a aumentar con respecto al tiempo. Los niveles más elevados se presentaron al final de experimento en ambos sitios de estudio; estos aumentos fueron significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto a la concentración inicial (Figura 21). Es de llamar la atención que fue en Actopan donde se presentaron los valores mayores de actividad POD durante todo el experimento. En este sitio, la actividad POD fue 4.1 veces mayor en junio con respecto a la inicial de febrero, mientras que en Tlaxcoapan el incremento fue de solo 2.5 veces. En la figura 21 también se puede observar que en abril la actividad POD no fue detectable en Tlaxcoapan. Esto mismo sucedió en Actopan en mayo.

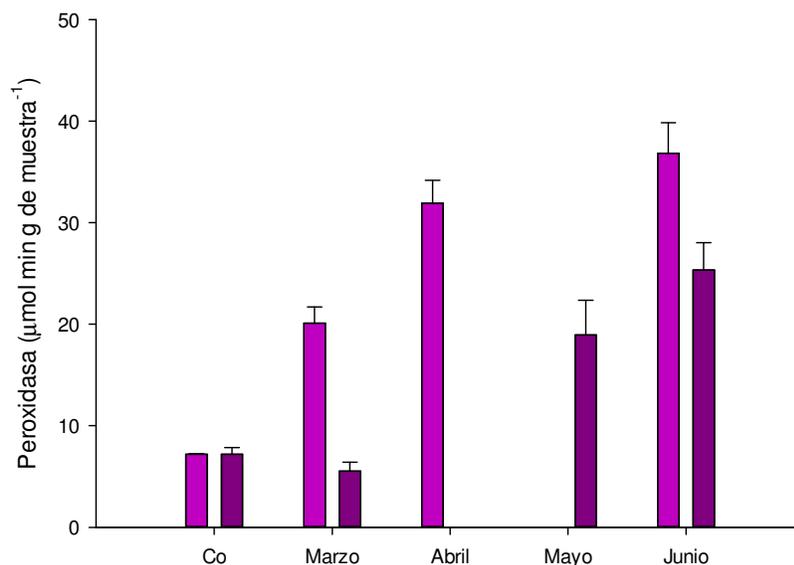


Figura 21. Actividad POD en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan.

En Actopan, la actividad POD se correlacionó positivamente con la concentración de Pb en  $\text{PM}_{10}$  ( $r = 0.687$ ,  $p < 0.01$ ) y negativamente con la concentración de Fe en el biomonitor y de  $\text{SO}_2$  en el aire ( $r = -0.647$  y  $-0.686$ , respectivamente,  $p < 0.01$ ). Al parecer, el incremento en la concentración de Pb en el biomonitor

incentiva la producción de POD como un mecanismo de detoxificación. La correlación negativa entre la actividad POD y el contenido de Fe en el biomonitor pudo deberse a la disminución de Fe que se observó en los primeros meses del experimento, cuando la POD iba en aumento. Como se comentó en el apartado 7.1, el Fe es un constituyente del grupo hemo de algunas enzimas, entre ellas la POD. En Tlaxcoapan únicamente se encontró correlación positiva entre la actividad POD y la concentración de Cu en el biomonitor ( $r = 0.476$ ,  $p < 0.01$ ). Posiblemente la menor actividad POD en Tlaxcoapan, en donde la concentración de los contaminantes estudiados era mayor, pudo deberse a una inhibición de la enzima precisamente por las concentraciones tan elevadas, o bien por la mezcla de contaminantes. Dazy *et al.* (2009) encontraron que la actividad de varias enzimas antioxidantes, entre ellas la POD, se incrementaba en *Fontinalis antipyretica* cuando la concentración de Cd, Cu, Pb y Zn a que era expuesta se encontraba entre 1-10  $\mu\text{M}$ ; cuando la concentración aumentaba, la actividad de las enzimas comenzaba a disminuir. También es probable que en Actopan la actividad POD se haya incrementado como respuesta a un contaminante diferente a los estudiados en este trabajo. Para corroborar la inhibición o no de la actividad POD en *T. usneoides* por los contaminantes estudiados y bajo las concentraciones encontradas, sería necesario realizar experimentos en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas.

#### **7.2.4. Superóxido dismutasa (SOD)**

##### **Experimento 1**

En la figura 22 se observa que la actividad SOD fue prácticamente la misma al inicio que al final del experimento ( $9.12 \pm 0.06$  a  $10.00 \pm 0.00 \text{ U g}^{-1}$ ).

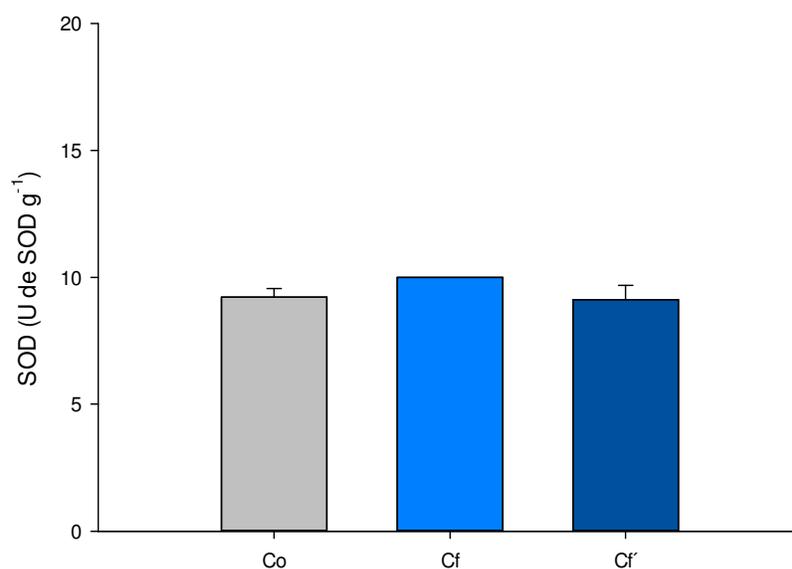


Figura 22. Concentración SOD en el biomonitor durante el experimento 1. ■ Co: concentración inicial, ■ Cf: concentración al final de la exposición (8 meses), Actopan, ■ Cf' concentración al final de la exposición (8 meses) Tlaxcoapan

## Experimento 2

Únicamente en marzo se presentó una disminución evidente en la actividad SOD en ambos sitios, de  $9.68 \pm 0.33$  U SOD g<sup>-1</sup> a  $7.81 \pm 1.91$  U SOD g<sup>-1</sup> y  $7.00 \pm 0.40$  U SOD g<sup>-1</sup> en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente. Solo esta última fue significativa con respecto a la concentración inicial ( $p < 0.05$ ). Durante los tres meses restantes de exposición no se cuantificó ningún cambio significativo en ninguno de los dos sitios de estudio (Figura 23).

El comportamiento observado de la actividad SOD en los dos experimentos de este trabajo ha sido reportado en otros estudios. Li (2003) encontró que la actividad SOD no variaba, en las hojas de *Ficus microcarpa*, en función de la concentración de contaminantes atmosféricos. En abetos rojos (Nast *et al.*, 1993), bajo condiciones de laboratorio y en plantas de calabaza (Ranieri *et al.*, 1994), la actividad SOD tampoco varió con la exposición a aire contaminado.

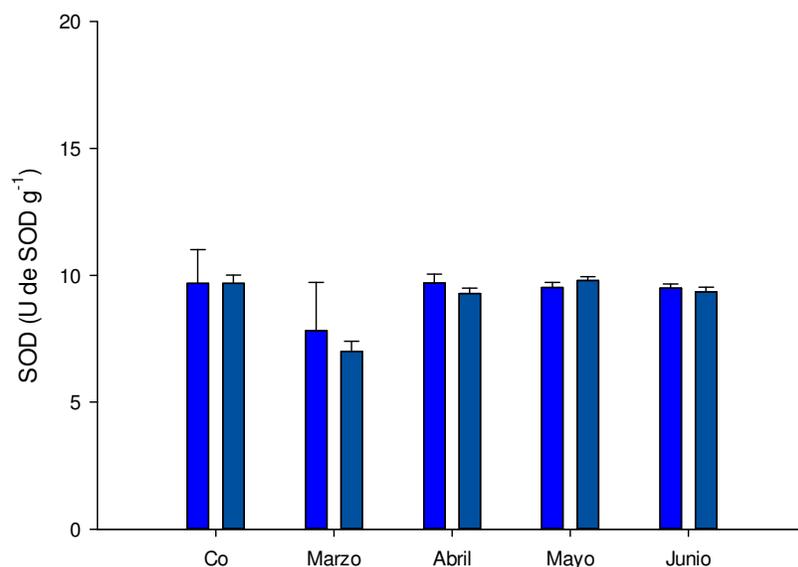


Figura 23. Concentración SOD en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, Actopan, Tlaxcoapan.

### 7.2.5. Nitrato reductasa (NR)

#### Experimento 1

En este experimento la actividad de la NR disminuyó ligeramente en el biomonitor expuesto en Actopan con respecto a la inicial ( $0.010 \text{ mol min g}^{-1}$ ); no así en Tlaxcoapan, donde se cuantificó una actividad 2.2 veces mayor que la inicial (Figura 24).

La NR es una enzima que se encuentra en la mayoría de las plantas superiores y es un regulador clave en la asimilación de nitrato (Campbell, 1988). En este experimento no fue posible cuantificar los gases; sin embargo, es válido suponer que existió la concentración suficiente de  $\text{NO}_2$  para inducir la acción de la NR en el biomonitor, de acuerdo al mecanismo que se comenta a continuación. Los  $\text{NO}_x$ , por encontrarse en forma gaseosa, entran a las plantas por medio de los estomas; una vez en el interior se disuelven en el agua intracelular transformándose en  $\text{NO}_3^-$ , sustrato inductor de la NR. También es posible que los  $\text{NO}_x$  se depositen sobre la superficie foliar, en donde reaccionan con el agua para formar  $\text{NO}_3^-$  que pueden ser asimilados por la planta (Rosas y Álvarez, 2009).

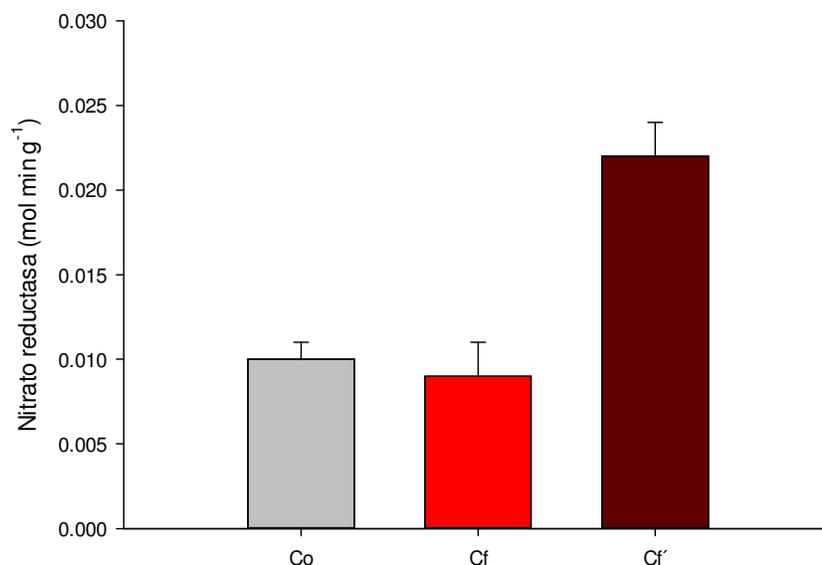


Figura 24. Concentración de NR en el biomonitor durante el experimento 1. ■ Co: concentración inicial, ■ Cf: concentración al final de la exposición en Actopan, ■ Cf' concentración al final de la exposición en Tlaxcoapan.

## Experimento 2

En Actopan, la actividad NR aumentó ligeramente en marzo, de 0.069 a 0.072 mol min g<sup>-1</sup>, después, en abril y mayo, decayó significativamente a 0.002 mol min g<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ) y en junio ya no fue detectable. En Tlaxcoapan, la actividad NR disminuyó drásticamente desde el primer mes de exposición, de 0.069 a 0.013 mol min g<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ) y en los meses restantes ya no fue cuantificable (Figura 25). El comportamiento anterior podría deberse a la baja concentración de NO<sub>2</sub> en la atmósfera en ambos sitios de estudio (0.008 y 0.019 ppm en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente) durante este experimento. En Actopan sí se observó una correlación positiva entre la actividad NR y la concentración atmosférica de NO<sub>2</sub> ( $r = 0.571$ ,  $p \leq 0.01$ ), mientras que en Tlaxcoapan esta correlación no se presentó.

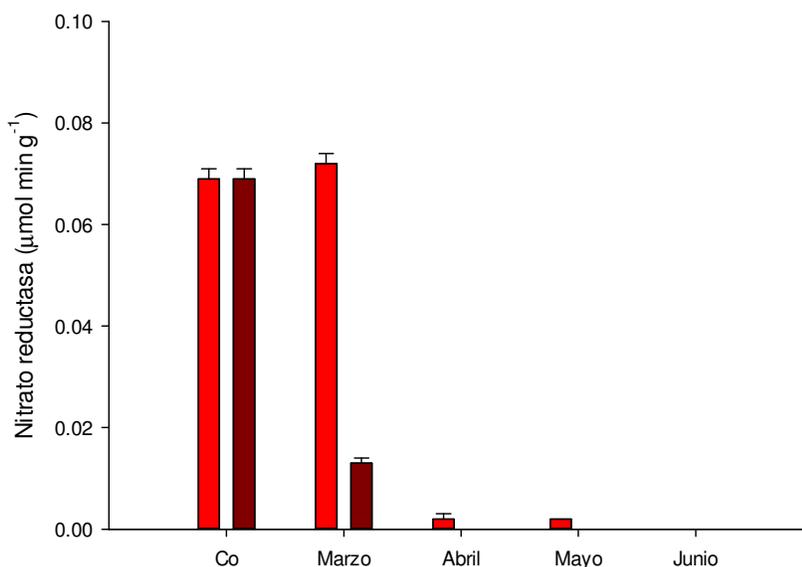


Figura 25. Concentración de NR en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, ■ Actopan, ■ Tlaxcoapan

### 7.2.6. Ácido ascórbico

#### Experimento 1

En la figura 26 se observa que el contenido de ácido ascórbico se incrementó significativamente en las muestras expuestas en Tlaxcoapan ( $9605 \mu\text{g g}^{-1}$ ) con respecto a las de Actopan ( $3747 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y al estado inicial ( $848 \mu\text{g g}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). El contenido final en Actopan también fue significativamente mayor al inicial ( $p < 0.05$ ). Un aumento en el contenido de ácido ascórbico es indicativo de la presencia de contaminantes, debido a que actúa como antioxidante para contrarrestar los efectos de los mismos. El ácido ascórbico protege a las macromoléculas del daño oxidativo que pueden causar las ROS, que se producen como respuesta a la presencia de contaminantes (Bahl y Kahl, 1995). En este experimento, la producción de ácido ascórbico en Tlaxcoapan se correlacionó positivamente ( $p \leq 0.01$ ) con las concentraciones de Ca ( $r = 0.995$ ), Cu ( $r = 0.998$ ), Pb, Zn y Mg ( $r = 0.999$ ) y negativamente con las de Fe y Mn, también en el biomonitor ( $r = -0.957$  y  $-0.997$ , respectivamente,  $p \leq 0.01$ ).

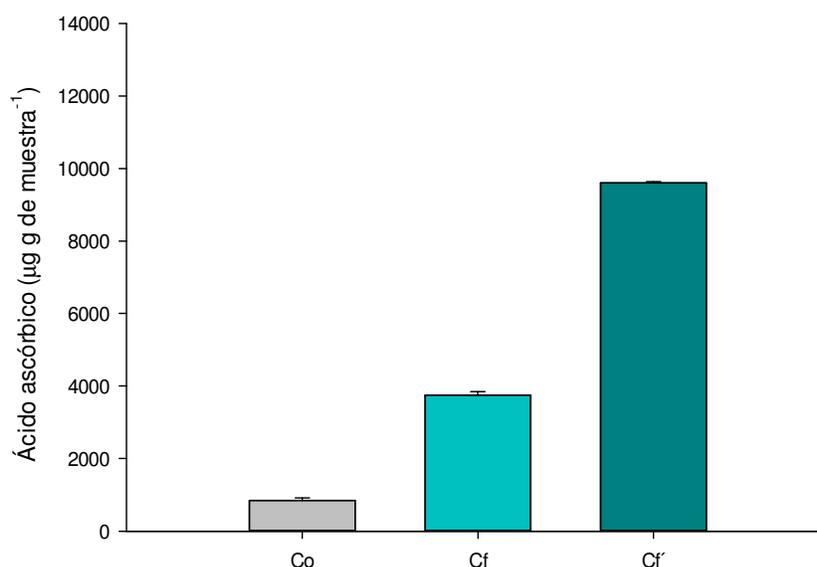


Figura 26. Concentración de ácido ascórbico en el biomonitor durante el experimento 1. ■ Co: concentración inicial, ■ Cf: concentración al final de la exposición en Actopan, ■ Cf' concentración al final de la exposición en Tlaxcoapan

En Actopan, la producción del ácido ascórbico se correlacionó positivamente con la actividad SOD y las concentraciones de Pb, Mg y Ca ( $r = 0.987, 0.994, 0.994$  y  $0.979$ , respectivamente,  $p \leq 0.01$ ). Los datos anteriores parecen indicar que la producción de ácido ascórbico en *T. usneoides* se incrementó como respuesta a la presencia de Ca, Cu, Fe, Mn y Pb en las concentraciones encontradas en los sitios de estudio.

## Experimento 2

En ambos sitios el contenido de ácido ascórbico presentó una tendencia a incrementar (Figura 27). En Actopan esta tendencia fue más clara y las concentraciones fueron mayores que en Tlaxcoapan. En los dos sitios las concentraciones finales ( $3465$  y  $2133 \mu\text{g g}^{-1}$  en Actopan y Tlaxcoapan, respectivamente) fueron significativamente mayores que la inicial ( $1517 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). Dado que los contaminantes incentivan la producción de ácido ascórbico como uno de los mecanismos de defensa de las plantas, se esperaría que la concentración de este metabolito fuera mayor en Tlaxcoapan, donde se

encontraron mayores concentraciones de los contaminantes estudiados. No obstante, también se ha encontrado que la acumulación de ácido ascórbico dependerá del balance entre la velocidad de su biosíntesis y la demanda de compuestos antioxidantes en la planta (Sharma *et al.*, 2012). Con base en lo anterior y en los resultados de los contaminantes evaluados, es muy probable que el biomonitor expuesto en Tlaxcoapan haya experimentado mayor estrés oxidativo y por lo tanto la demanda de especies antioxidantes no permitía que se acumularan en la misma proporción que se detectó en Actopan.

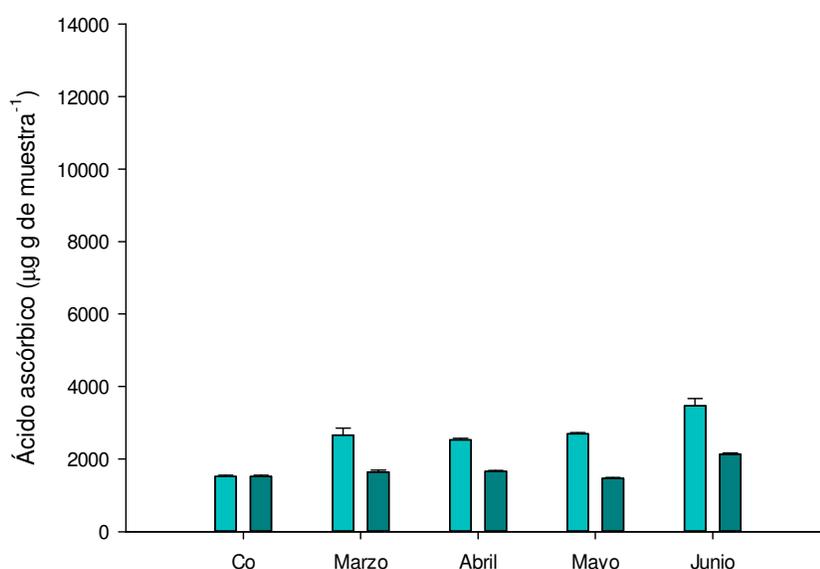


Figura 27. Concentración ácido ascórbico en el biomonitor durante el experimento 2. Co: concentración inicial, Actopan, Tlaxcoapan.

### 7.3. Material particulado

La emisión de partículas y gases potencialmente nocivos a la salud humana y el ambiente deteriora los recursos necesarios para el desarrollo ambiental de las áreas urbanas. Los metales pesados se han encontrado como parte de los contaminantes identificados en el aire y el suelo de las áreas urbanas. Las emisiones de metales pesados a la atmósfera se asocian con fuentes naturales (tormentas de arena, emanaciones volcánicas e incendios forestales), y fuentes antropogénicas (fijas y móviles); estas últimas son las de mayor importancia en las áreas urbanas (Juda-Rezler *et al.*, 2011).

#### 7.4. Partículas PM<sub>10</sub> en los sitios de estudio

En la figura 28 se presenta la serie de tiempo de las partículas PM<sub>10</sub> recolectadas en Actopan y Tlaxcoapan durante el segundo experimento (febrero a junio del 2012). Las concentraciones de PM<sub>10</sub> obtenidas en Actopan van desde 16  $\mu\text{g m}^{-3}$  como concentración mínima hasta 107  $\mu\text{g m}^{-3}$  como concentración máxima. Por otra parte, en Tlaxcoapan la concentración mínima es de 26  $\mu\text{g m}^{-3}$  y alcanza 111  $\mu\text{g m}^{-3}$  como concentración máxima. Vale la pena mencionar que en ambos sitios se sobrepasó la concentración de 75  $\mu\text{g m}^{-3}$  (promedio de 24 h), límite máximo permisible establecido en la normatividad mexicana (NOM-025-SSA1-2014). En Tlaxcoapan el límite anterior se sobrepasó en cinco ocasiones, mientras que en Actopan sucedió solo en tres. Vale la pena mencionar que el límite permisible actual de 75  $\mu\text{g m}^{-3}$  fue revisado hace poco más de un año, y aunque es más estricto que el anterior (120  $\mu\text{g m}^{-3}$ ), aún es mayor que el estándar internacional, de 50  $\mu\text{g m}^{-3}$  (promedio de 24 h), establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) y por la Comunidad Europea (EC, 2015; WHO, 2006). Este último límite se sobrepasó en repetidas ocasiones en ambos sitios de estudio. Con base en lo anterior, se puede decir que aún es necesario mejorar la calidad del aire en la zona de estudio y revisar continuamente la normatividad vigente para asegurar que vele por salvaguardar la salud de la población.

Actualmente no existen estudios previos que reporten la calidad del aire en Actopan en términos del contenido de PM<sub>10</sub> o algún otro contaminante. Para Tlaxcoapan sí existen estudios que han cuantificado el material particulado en la zona. Martínez-Reséndiz (2008) realizó un estudio de junio a diciembre del 2007, donde muestra que en el lapso de la campaña de muestreo la concentración de PM<sub>10</sub> tampoco sobrepasó la normatividad mexicana. Las concentraciones más altas que se encontraron fueron 99 y 118  $\mu\text{g m}^{-3}$ , esta última ligeramente similar a las que se obtuvieron en este estudio.

El análisis estadístico realizado a estos datos (entre concentración mínima y máxima) muestra lo siguiente: 1) una diferencia significativa entre la concentración

mínima entre los dos sitios, 2) una diferencia significativa entre la concentración máxima entre los dos sitios y 3) entre la concentración mínima y máxima de cada uno de los sitios también existe una diferencia significativa.

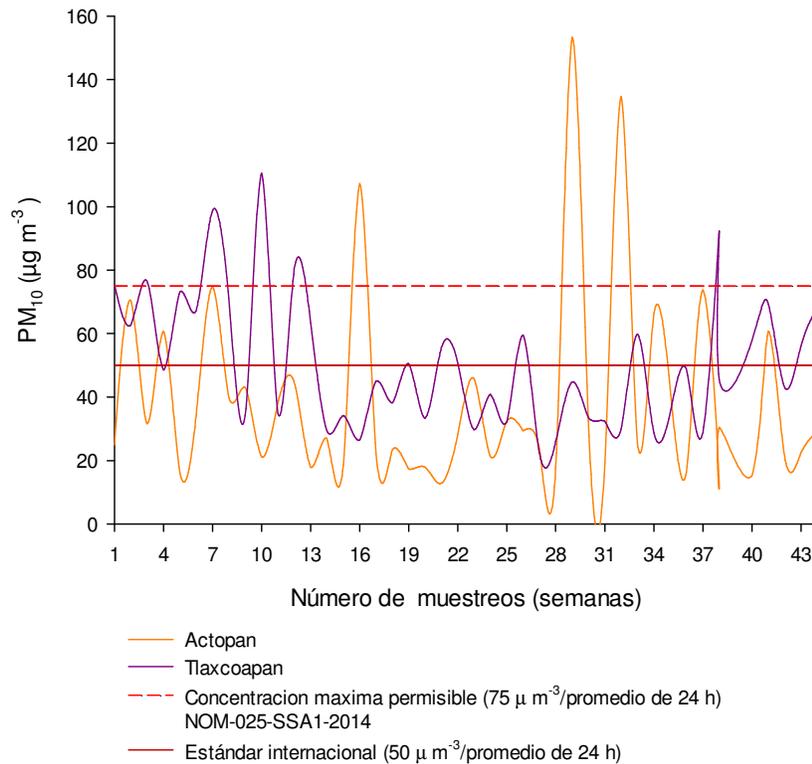


Figura 28. Series de tiempo de PM<sub>10</sub> en Actopan y Tlaxcoapan.

En la figura 29 se muestran las concentraciones promedio de PM<sub>10</sub> de cada uno de los sitios de estudio. No existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la concentración promedio de Actopan ( $42 \pm 25 \mu\text{g m}^{-3}$ ) y Tlaxcoapan ( $62 \pm 25 \mu\text{g m}^{-3}$ ). Estadísticamente la concentración de material particulado presente en la atmósfera de los sitios de estudio es similar. Sin embargo, su procedencia y su contenido de elementos pueden llegar a ser de distinta fuente emisora. De acuerdo al estudio descrito por Martínez-Reséndiz (2008) la procedencia del material particulado de Tlaxcoapan es principalmente la industria de la construcción y el cemento. Por otra parte, en Actopan no hay antecedentes de estudios que evalúen la calidad el aire y tampoco se conocen fuentes industriales que sean capaces de contribuir a la carga de material particulado.

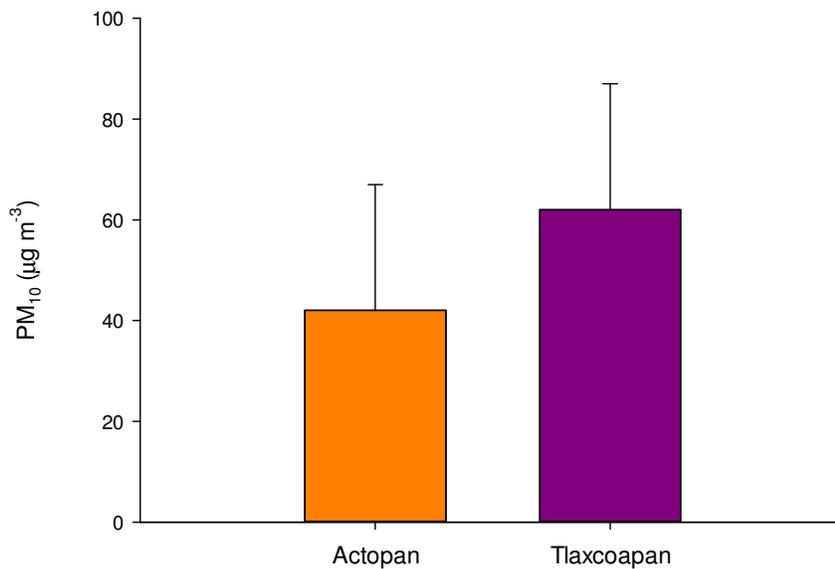


Figura 29. Concentración promedio de PM<sub>10</sub> en los sitios de estudio.

### 7.5. Elementos en el material particulado

Algunos elementos volátiles como el Zn y Pb pueden ser transportados por gases y cenizas suspendidas en el aire y depositarse en el agua y el suelo. Por lo tanto, estos elementos metálicos pueden ser transportados por el escurrimiento superficial de las cuencas hacia los sistemas de drenaje, arroyos, humedales y ríos, que suelen ser sus principales receptores (Álvarez y Trento, 2004). También se ha reportado que alrededor del 89% de los metales pesados se disuelven en el agua de lluvia y, por lo tanto, pueden llegar a la vegetación y a los suelos por procesos que favorecen la ruta de entrada a los organismos vivos (Valenta *et al.*, 1986). Una vez en el suelo, los metales pesados pueden quedar retenidos, pero pueden ser movilizados en la solución del suelo mediante mecanismos biológicos y químicos (Pagnanelli *et al.*, 2004). Algunas sustancias en particular pueden ser consideradas como un contaminante del aire, únicamente cuando su concentración es relativamente alta en comparación con el valor que hay en el suelo y si además causa efectos adversos. Aun cuando se conoce que para la mayoría de los elementos presentes en el material particulado, no existe una normatividad que señale los límites permisibles, al realizar el análisis del contenido

de elementos en PM<sub>10</sub> en el sitio de Actopan se observó q las concentraciones de los elementos analizados fueron: Cu<Zn<Mn<Pb<Fe<Ca<Mg (Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones de elementos en PM<sub>10</sub> en Actopan durante el segundo experimento.

Elemento	Mn	Zn	Cu	Mg	Fe	Pb	Ca
	ng m <sup>-3</sup>						
<b>Filtros (n)</b>	16	16	16	16	16	16	16
<b>Media</b>	29	17	15	11373	658	37	5653
<b>Mínimo</b>	15	5	3	1349	215	3	1758
<b>Máximo</b>	48	29	48	37918	1922	70	11043
<b>Q<sub>1</sub></b>	16	14	5	1886	422	12	3624
<b>Q<sub>3</sub></b>	38	20	13	14990	878	56	6569
<b>σ</b>	12	7	16	11954	420	24	2560

Q<sub>1</sub>= 25o percentil

Q<sub>3</sub>= 75o percentil

σ= Desviación estándar

El Mg y el Ca fueron los elementos mayoritarios; sin embargo, su procedencia no es clara, ya que no se han identificado industrias como una de las fuentes emisoras de este elemento. Su presencia en la atmósfera podría ser por su existencia en suelo que por las condiciones meteorológicas del sitio podría llegar a la atmósfera. De acuerdo con Prieto-García *et al.* (2007), los suelos del sitio de Actopan son tipo fluvisoles y feozems háplicos, y presentan concentraciones de Ca de 626.07 mg kg<sup>-1</sup> \*10<sup>3</sup> y 417.25 mg kg<sup>-1</sup> \*10<sup>3</sup> en un primer y segundo sitio de estudio respectivamente. Con respecto al manganeso, este pudiera encontrarse en la corteza terrestre.

En el caso de Fe, la principal fuente de emisión para este elemento pudiera ser el polvo del suelo. El Mn, Pb, Zn y Cu, cuyas concentraciones fueron las más bajas; tienen como principales fuentes emisión la incineración, la combustión del petróleo y los motores de vehículos, estas fuentes no se descartan en Actopan, ya que se puede identificar la incineración de basura a cielo abierto principalmente. Los valores mínimo, máximo, cuartil 2 y cuartil 3 que son los valores pertenecientes al 25 y 75% del total de los datos obtenidos, se pueden observar en la tabla 7. El Pb es un elemento regulado por la normatividad mexicana que especifica que la concentración máxima permisible es de 1500 ng m<sup>-3</sup>. Se puede observar que la

concentración obtenida en este estudio no es mayor a la concentración máxima permisible.

Al realizar el análisis del contenido de elementos en PM<sub>10</sub> en Tlaxcoapan se observó que las concentraciones de los elementos analizados fueron: Zn<Cu<Pb<Mn<Fe<Ca<Mg (Tabla 8). Elementos como el Ca y el Mg, que fueron los elementos con mayor concentración, son emitidos principalmente por la combustión del carbón, la industria de la construcción/cemento y las industrias asentadas en el sitio emisor. En el caso de Fe, que se encontró en una concentración media, las principales fuentes de emisión son el polvo del suelo, la combustión del carbón, la industria de la construcción/cemento, la incineración y el smog. El Mn Pb, Zn y Cu, cuyas concentraciones fueron las más bajas, se encuentran presentes en las emisiones generadas por la incineración, la industria, la combustión del petróleo y los motores de vehículos, principalmente.

Tabla 8. Concentración de elementos en PM<sub>10</sub> en Tlaxcoapan durante el segundo experimento.

Elemento	Mn	Zn	Cu	Mg	Fe	Pb	Ca	
	ng m <sup>-3</sup>							
<b>Filtros (n)</b>	16	16	16	16	16	16	16	
<b>Media</b>	63	16	19	11766	458	39	1380	
<b>Mínimo</b>	27	6	6	144	189	9	569	
<b>Máximo</b>	82	27	52	37991	697	82	2168	
<b>Q<sub>1</sub></b>	53	12	14	1729	294	26	895	
<b>Q<sub>3</sub></b>	77	20	21	18537	609	50	1839	
<b>σ</b>	16	6	10	13076	172	21	524	
	Q <sub>1</sub> = 25o percentil	Q <sub>3</sub> = 75o percentil	σ= Desviación estándar					

En la siguiente tabla (9) se muestra una comparación de las concentraciones de los elementos evaluados en este estudio y los evaluados por Martínez-Carrillo *et al.* (2010) en el mismo sitio de estudio (Tlaxcoapan)

Tabla 9. Promedio de la masa y concentraciones de elementos en la fracción gruesa de Tlaxcoapan, Hidalgo y el norte de la Ciudad de México.

Elemento	Tlaxcoapan 2013	Tlaxcoapan* 2010	Estándar primario / organismo regulador $\mu\text{g m}^{-3}$
<b>Filtros</b>	16	21	
<b>PM<sub>10</sub> (<math>\mu\text{g m}^{-3}</math>)</b>	62(25)	46(5)	50 $\mu\text{g m}^{-3}$ Anual/ USEPA
<b>Ca(<math>\text{ng m}^{-3}</math>)</b>	<b>1380(524)</b>	4.93 (0.94)	nr
<b>Mn</b>	<b>63 (16)</b>	15 (2)	nr
<b>Fe</b>	<b>458(172)</b>	511 (35)	nr
<b>Cu</b>	19(10)	12 (1)	nr
<b>Zn</b>	<b>16 (6)</b>	17 (2)	nr
<b>Pb</b>	<b>39(21)</b>	25 (2)	1.5 $\mu\text{g m}^{-3}$ Diario / USEPA

\*Martínez-Carrillo *et al.*, 2010

En la tabla anterior podemos observar que hay ligeras variaciones en las concentraciones de los elementos entre este estudio (2013) y el realizado en el 2010. El único elemento significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) es el Ca.

### 7.6. Gases atmosféricos

La concentración de los contaminantes varía localmente por la convergencia o divergencia de los vientos, debido a que la masa es transportada (*i. e.*, horizontal o verticalmente) hacia o desde un área determinada por la presencia de flujos turbulentos; así mismo, la concentración puede variar por fuentes de emisión de contaminantes y por sumideros locales (p.ej., transformaciones físicas y químicas y remoción por lluvia) (Bustos y Gallardo, 2004). Por lo tanto, la dispersión de los contaminantes a nivel local depende de parámetros meteorológicos como la velocidad del viento, que en Actopan osciló entre los 0.403-1.74  $\text{m s}^{-1}$  y en Tlaxcoapan 0.627-1.936  $\text{m s}^{-1}$ . De acuerdo con la Escala de Beaufort, ambas son considerados vientos en calma. La dirección del viento, en Actopan, proviene en su mayoría del Norte y el este (Figura 30), mientras que en Tlaxcoapan el viento proviene del oeste, sur y este (Figura 31). La temperatura en promedio fue de 30°C en Actopan y en Tlaxcoapan fue de 29.44°C (Turtós *et al.*, 2003).

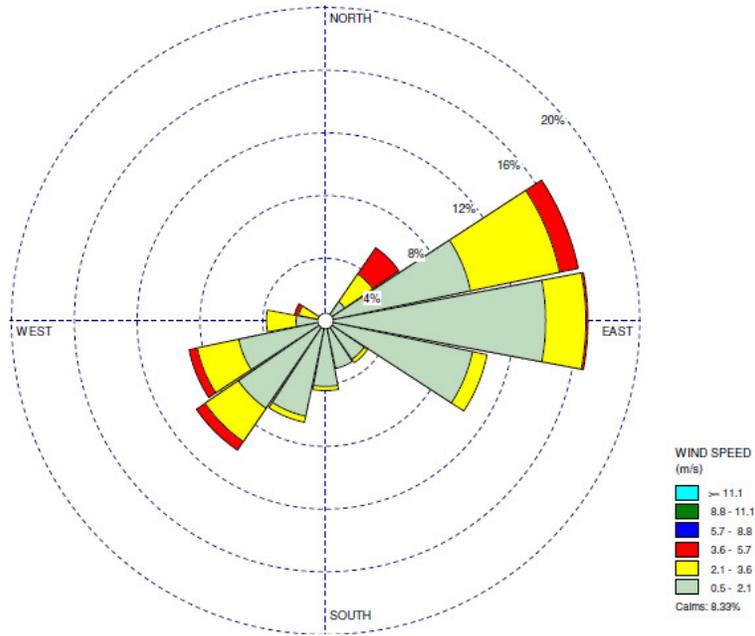


Figura 30. Rosa de vientos del sitio Actopan.

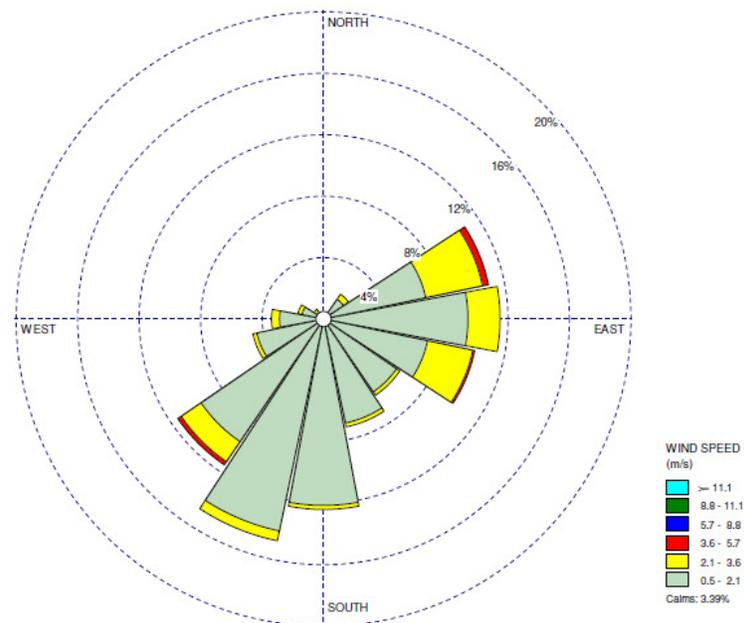


Figura 31. Rosa de vientos del sitio Tlaxcoapan.

El desarrollo industrial se ha asociado con la emisión de grandes cantidades de gases y partículas a la atmósfera, provenientes tanto de la producción industrial como de la quema de combustibles fósiles para la energía y el transporte. En Actopan, durante el segundo experimento, se cuantificaron concentraciones de  $\text{NO}_2$  de 0 a 0.008 ppm, muy similares a la que se encontraron en Tlaxcoapan (0.00 - 0.010 ppm) (Figura 32). Por lo tanto, en ninguno de los sitios de estudio se sobrepasan las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-023-SSA1-1993, que establece un límite máximo 0.21 ppm. Esto equivalente a  $395 \mu\text{g m}^{-3}$  en una hora una vez al año, como protección a la salud de la población susceptible.

Las concentraciones encontradas en este estudio son muy bajas, si se considera que en la zona de estudio existen diversas fuentes emisoras de gases nitrogenados, como la termoeléctrica Francisco Pérez Ríos, la refinera Miguel Hidalgo y demás empresas que usan combustibles fósiles en sus procesos, así como el parque vehicular. Posiblemente, las bajas concentraciones de  $\text{NO}_2$  cuantificadas se deban a que este es solo uno de los óxidos que se pueden encontrar en la atmósfera, aunque se considera que es el principal, razón por la que seleccionó para este estudio. Las múltiples transformaciones que experimentan los óxidos de nitrógeno también podrían explicar las bajas concentraciones detectadas. Para confirmar esto sería recomendable medir en estudios futuros contaminantes producto de dichas transformaciones, por ejemplo el ozono ( $\text{O}_3$ ), producto de las transformaciones diurnas de los  $\text{NO}_x$  o el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se forma durante la noche (Galán y Fernández, 2006).

Por otra parte, el  $\text{SO}_2$  fue el gas que se presentó en mayor concentración en la siguiente gráfica (Figura 33) se observa el comportamiento que se presentó durante el estudio.

La concentración de dióxido de azufre como contaminante atmosférico no debe rebasar el límite máximo normado de  $288 \mu\text{g m}^{-3}$  o 0.110 ppm promedio en 24 horas, una vez al año, para protección a la salud de la población. Sin embargo, en Tlaxcoapan este valor fue sobrepasado en 3 ocasiones, de acuerdo a lo especificado en la NOM-022-SSA1-2010.

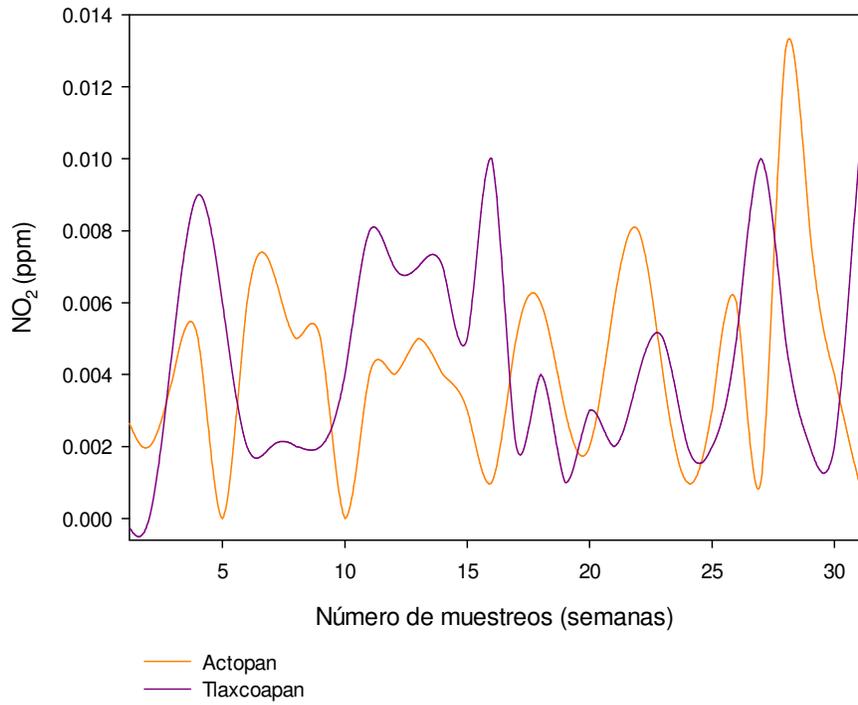


Figura 32. Concentración de NO<sub>2</sub> en los sitios de estudio.

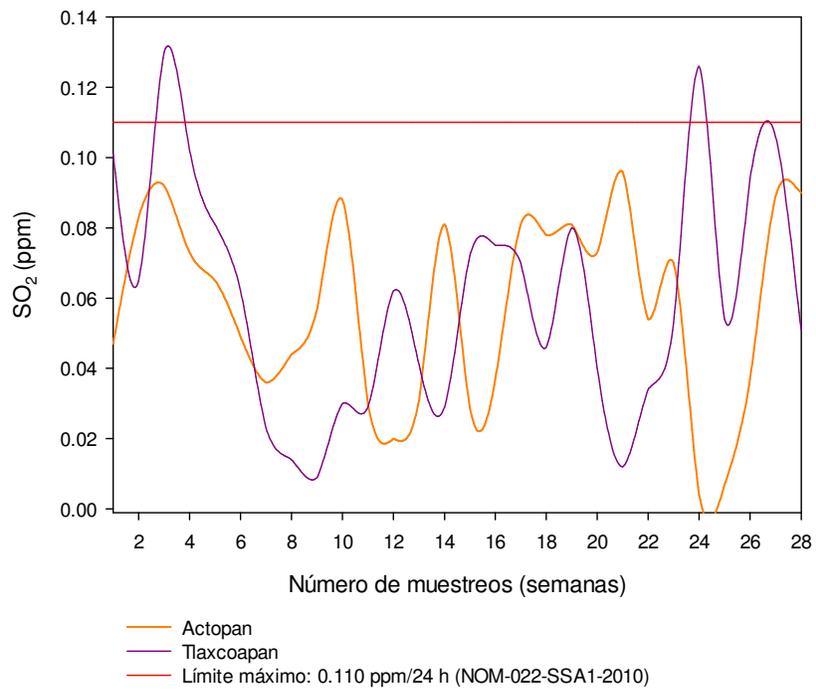


Figura 33. Concentración promedio (24 h) de SO<sub>2</sub> en los sitios de estudio.

La concentración del promedio de ocho horas de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), debe ser menor o igual a 524 µg m<sup>-3</sup> o 0.200 ppm promedio horario para no ser rebasado dos veces al año. Sin embargo, durante este estudio en Tlaxcoapan este valor fue rebasado en una ocasión.

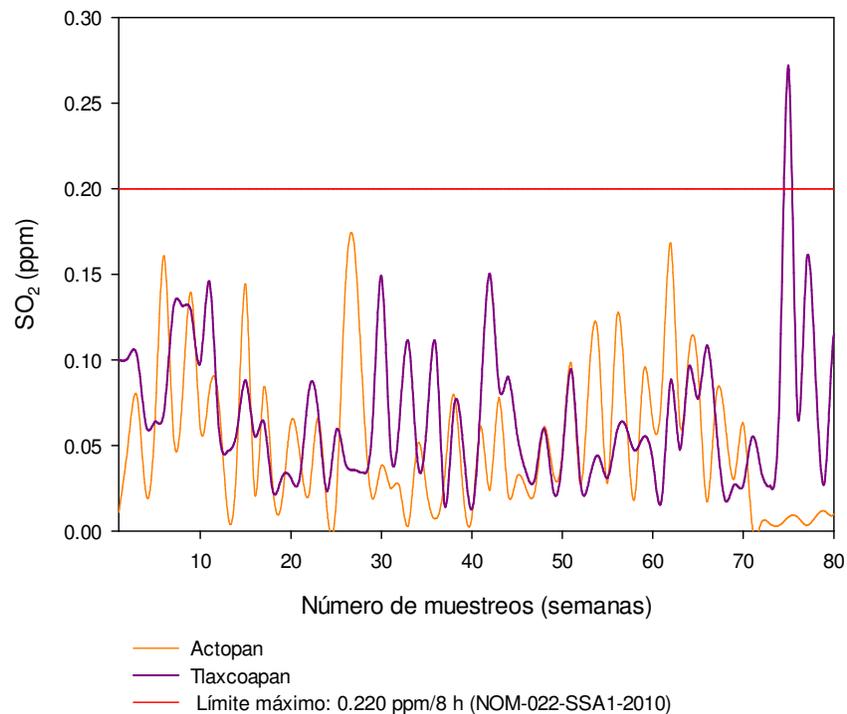


Figura 34. Concentración promedio (8 h) de SO<sub>2</sub> en los sitios de estudio.

Esta misma norma también especifica que la concentración de dióxido de azufre como contaminante atmosférico no debe rebasar el límite máximo normado de 66 µg m<sup>-3</sup> o 0.025 ppm promedio anual para protección a la salud de la población; sin embargo no se cuenta con la suficiente cantidad de datos para validar este punto.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados mostraron que Tlaxcoapan sí es un sitio receptor de contaminantes generados en el corredor industrial TVA. Por otra parte, Actopan también presentó concentraciones importantes de algunos contaminantes, contrario a lo que se esperaría de un sitio control, por lo que sería interesante determinar el origen de la contaminación en este sitio.

De acuerdo con la normatividad internacional vigente, la calidad del aire en Tlaxcoapan y Actopan, no cumple la mayor parte del tiempo con los estándares establecidos en cuanto a concentración de PM<sub>10</sub>. También es evidente que la normatividad mexicana debe continuar revisándose y elevando sus niveles de exigencia para salvaguardar la salud de la población.

En cuanto al biomonitor, se corroboró la utilidad de *T. usneoides* para reflejar cambios de algunos contaminantes atmosféricos en un amplio rango de concentraciones. Así mismo, se confirmó la capacidad de acumulación de Ca y Pb de *T. usneoides*, lo que hace de estos dos elementos buenos biomarcadores de exposición en este biomonitor. En los que respecta a los biomarcadores de efecto, las clorofilas, el ácido ascórbico y la actividad POD podrían ser empleados como tales en este biomonitor, una vez que se determine el rango de concentraciones en que no se ve afectada su biosíntesis o funcionamiento por los contaminantes.

También se encontró que los metales que se correlacionaron con la producción de las clorofilas, el ácido ascórbico y la actividad POD, fueron Pb, Ca, Fe, Mn, Mg y Cu. Dado lo anterior, sería interesante confirmar si la actividad POD se ve afectada a determinadas concentraciones de los elementos de estudio con los que presentó correlaciones negativas, principalmente Pb y Ca serían de interés, el primero por su carácter tóxico y el segundo por su abundancia en la zona de estudio.

Un experimento bajo condiciones controladas, en una cámara de crecimiento vegetal, aportaría información importante, como el intervalo de concentraciones de contaminantes en que las clorofilas, el ácido ascórbico y la actividad POD son

útiles como biomarcadores. Un experimento de este tipo también permitiría confirmar el posible efecto inhibitorio de los gases  $\text{NO}_2$  y  $\text{SO}_2$  sobre la producción de clorofilas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A.B., Bucher, E.H. (2009). A comparison of nutrient sources of the epiphyte *Tillandsia capillaries* attached to trees and cables in Cordoba, Argentina. *Journal of Arid Environments*. 73, 393-395.
- Acosta, A.M.M. (2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo. Tesis de licenciatura. Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 1-101.
- Agbaire, P.O., Akporhonor, E. E. (2014). The effects of air pollution on plants around the Vicinity of the Delta Steel Company, Ovwian-Aladja, Delta State, Nigeria. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 8, 61-65.
- Alekhina, D.N., Kharltonashvili, V.E., Rlznichenkot, Y.G., Plusninat, Y.T., Sidorov, V.S., Rubint, V.A. (2000). A multi compartments model of nitrate metabolism regulation in plant roots. *Journal of Biological Systems*. 8, 219-235.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, S.L. (2002). Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1331-1341.
- Álvarez, A., Trento, A. (2004). Transporte de metales pesados en cursos fluviales. *Mecánica Computacional*. 23, 1151-1165.
- Arancibia, M.P.C., Velásquez V.V.E. (2001). Análisis comparativo de modelos de calidad del aire y su aplicación en actividades desarrolladas en proyectos viales. Tesis de grado. Universidad de Santiago de Chile. Departamento de Ingeniería Geográfica. pp. 1-52.
- Areington, A.C., Varghese, B., Ramdhani, S.S. (2015). An Assessment of Morphological, Physiological and Biochemical Biomarkers of Industrial Air Pollution in the Leaves of *Brachylaena discolor*. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 1-14.
- Azcón-Bieto, R., Pardo, A., Gómez-Casanovas, N., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M. (2003). Respuestas de la fotosíntesis y la respiración en un medio ambiente variable. En: Reigosa, M. J., Pedrol, B. N. y Sánchez, M. A. (Eds.) *La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis*. Thomson. Madrid. Pp. 873-900.
- Bahl, A., Kahl, G. (1995). Air pollutant stress changes the steady-state transcript levels of three photosynthesis genes. *Environmental Pollution*. 88, 57-65.
- Bansal, N. y Kanwar, S.S. (2013). Peroxidase(s) in environment protection. *The Scientific World Journal*. 13, 1-9.
- Benford, J.D., Hanley, B., Bottrill, K., Oehlschlager, S., Balls, M., Branca, F., Castegnaro, J.J., Descotes, J., Hemminiki, K., Lindsay, D., Schilter, B. (2000). *Biomarkers as predictive tools in toxicity testing*. ATLA. 28, 119-131.

- Bermúdez, M.A.G. y Pignata, M.L. (2011). Antioxidant Response of Three *Tillandsia* Species Transplanted to Urban, Agricultural, and Industrial Areas. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 61, 401-413.
- Beüler, B., Schmitgen, S., Kühnemann, F., Gäbler, R., Urban, W. (1998). Light-dependent production of ethylene in *Tillandsia usneoides* L. *Planta*. 2005, 140-144.
- Bhardwaj, P., Chaturvedi, K.A., Prasad, P. (2009). Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Nature and Ciencia*. 7, 63-75.
- Billings, H.F. (1904). A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette*. 38, 99-121.
- Bose, J., Babourina, O., Rengel Z. (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62, 2251-2264.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- Briggs, D. (2003). Environmental pollution and the global burden of disease. *British Medical Bulletin*. 68, 1-24.
- Brighigna, L., Ravanelli, M., Minelli, A., Ercoli, L. (1997). The use of an epiphyte (*Tillandsia caput-medusae* morren) as a bioindicator of air pollution in Costa Rica. *Science of the Total Environmental*. 198, 175-180.
- Bustos, S.C., Gallardo, K.L. (2004). *Aplicación de modelos de dispersión atmosférica en la evaluación de impacto ambiental: análisis del proceso*. Tesis de magister. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp 50.
- Calvario, R.C.I. (2012). Monitoreo y biomonitoreo de elementos atmosféricos en la región de Tula-Tepeji empleando *Tillandsia usneoides* L. Tesis de doctorado. Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 1-164.
- Campbell, W.H. (1988). Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *What's new in plants physiology*. 74, 214-219.
- Carballeira A. y Fernández J. A. (2002): Bioconcentration of metals in the moss *Scleropodium purum* in the area surrounding a power plant. A geotopographical predictive model for mercury. *Chemosphere*. 47, 1041-1048.
- Carballeira, O.A. (2003). Biomonitorización de la calidad ambiental de Galicia. En: Consellería de Medio Ambiente. Reflexiones sobre el medio ambiente en Galicia. Litor. Galicia, España.
- Carbone, S., N'siala, M.S., Gatti, A., Capitani, F., Vianello, G., Antisari, L. (2012). Exposure of *Tillandsia usneoides* at silver nanoparticles. *Brno, Czech Republic*. 10, 23-25.

- Casierra-Posada, F., Poveda, J. (2005). Manganese and zinc toxicity reduce dry matter production, leaf pigment and fruit quality in strawberries (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). *Agronomía Colombiana*. 23, 283-289.
- CBMAPDT, CIS, DELS, NRC. (1989). Biologic markers of air-pollution stress and damage in forest. National Academic Press. Washington, D.C. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/1414/biologic-markers-of-air-pollution-stress-and-damage-in-forests>. Consultado el 14 de enero de 2015.
- Chakraborty, S., Tryambakro, P.G. (2006). Biomonitoring of trace element air pollution using mosses. *Aerosol and Air Quality Research*. 6, 247-258.
- Channels, L., Tokumoto, T., Jobilong, E., Brooks, S.J., Nellutla, S., Dalal, S.N. (2006). Dielectric, electron paramagnetic resonance, and transport properties of Spanish Moss. *Journal of Low Temperature Physics*. 142, 1-6.
- Chinmayee, D.M., Anu, M.S., Mahesh, B., Sheeba A.M., Mini, I., Swapna, T.S. (2014). A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. *Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 8, 58-76.
- Cortez-Lugo, M., Téllez-Rojo, M.M., Gómez-Dantés, H., Hernández-Ávila, M. (2003). Tendencia de los niveles de plomo en la atmósfera de la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Salud Pública México*. 45, 196-202.
- Cuadra Z.D.C., Romero, G.D.A. (2006). Aplicación de biomonitores para evaluar la contaminación por metales pesados en el lago de Suchitlán. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador.
- Dailianis, S. (2010). Environmental impact of anthropogenic activities: the use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. In: McGevin L. (Ed.) *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*. Nova Science Publishers. Patras, Greece. pp 43-72.
- Daly, A., Zannetti, P. (2007). An introduction to air pollution-definitions, classifications and history. In: Zannetti, P., Al-Ajmi, D., Al-Rashied, S. (Eds.) *Ambient air pollution*. The Arab School for Science and Technology. The EnviroComp Institute, Fremont, CA (USA)
- Dazy, M., Masfaraud, J.F., Féraud, J.F. (2009). Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*. 75, 297-302.
- De Foy, B., Fast, D.J., Paech, J.S., Phillips, D., Walters, T.J., Coulter, L.R., Martin, J.T., Pekour, S.M., Shaw, J.W., Kastendeuch, P.P., Marley, A.N., Retama, A., Molina, T.L. (2007). Basin scale wind transport during the MILAGRO field campaign and comparison to climatology using cluster analysis. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*. 7, 13035-13076.

- EC, European Community (2015). Air Quality Standards. Environment. Recuperado de: <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.htm>. Fecha de consulta: Agosto 26, 2015.
- Elías, C., Fernández, E.A.N., França, E.J., Bacchi, M.A., Tagliaferro, F.S. (2008). Native bromeliads as biomonitors of airborne chemical elements in a Brazilian restinga forest. *Journal of Radio analytical and Nuclear Chemistry*. 278, 423-427.
- Ernst, W.H.O., Peterson, P.J. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicology*. 3, 180-192.
- Fadila, K., Houria, B., Mohammed-Réda, D. (2012). Study of atmospheric pollution emitted rated a plant of fertilizers (Algeria) by the use of bioindicator plants: lichens. *Advances in Environmental Biology*. 6, 1823-1833.
- Fidalgo, H.C., Petit, D.M.D., García, G.R., Hungría, S.P., Sancho, G.I. (2005). Higher plants as bioindicators of sulphur dioxide emissions in urban environments. *Environmental Monitoring and Assessment*. 111, 75-88.
- Figueiredo, A.M.G., Saiki, M., Ticianelli, R.B., Domingos, M., Alves, E.S., Markert, B. (2001). Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. *Journal of Radio analytical and Nuclear Chemistry*. 249, 391-395.
- Figuereido A.M.G., Nogueria C.A., Saiki M., Milian F.M. y Domingos M. (2007): Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of Sao Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor. *Environ. Pollut.* 145: 279-292.
- Filho G.M.A., Andrade L.R., Farina M., Malm O. (2002). Hg localisation *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae); an atmospheric biomonitor. *Atmospheric Environmental*. 36, 881-887.
- Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F., Sessitsch, A. (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *International Society for Microbial Ecology*. 2, 561-570.
- Galán, M.D. y Fernández, P.R. (2006). Implicación de los NOx en la química atmosférica. *M+A Revista Electrónica de Medioambiente*. 2, 90-103.
- García, P.P.E., Azcona, C.M.I. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 17, 199-205.
- Garg, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N Sinha, S., Chandra P. (1997). Cadmium accumulation and toxicity in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) royle. *Environmental Monitoring and Assessment*. 47, 167-173.
- Garth, E.R. (1964). The ecology of spanish moss (*Tillandsia usneoides*): Its growth and distribution. *Ecology*. 3, 470-481.
- Ghorbanli, M., Bakand, Z., Bakhshi khaniki, G., Bakand, S. (2007). Air pollution effects on the activity of antioxidant enzymes in *Nerium oleander* and

- Robinia pseudo acacia* plants in Tehran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 3, 157-162.
- Gil, F., Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. Department of Legal Medicine and Toxicology. *Journal of Applied Toxicology*. 21, 245-255.
- Gobierno del Estado de Hidalgo. (2014). Enciclopedia de los Municipios de Hidalgo. Tlaxcoapan. Secretaría de Planeación. Pachuca de Soto, Hidalgo: 15.
- Gobierno del Estado de Hidalgo. (2014). Enciclopedia de los Municipios de Hidalgo. Actopan. Secretaría de Planeación. Pachuca de Soto, Hidalgo: 15.
- Goday A., Pagés, M. (2004). Proteínas de respuesta al estrés hídrico. En: Reigosa, M. J., Pedrol, B. N. y Sánchez, M. A. (Eds.) *La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis*. Thomson. Madrid. Pp. 791-832.
- Hamid, N y Jawaid, F. (2009). Effect of short-term exposure of two different concentrations of sulphur dioxide and nitrogen dioxide mixture on some biochemical parameter of *Soybean (Glycine max (L.) Merr.)*. *Pakistan Journal of Botany*. 41, 2223-2228.
- Hansford, T., Shacklette, T., Connor J.J. (1973). Airborne chemical elements in Spanish moss. *Geological Survey Professional Paper*. E1-E5.
- Hecht, B.C., Jorns, C.A., Keil, P. (1987). Effect of excess aluminum and manganese on Norway spruce seedlings as related to magnesium nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. 10, 1103-1110.
- Heintzenberg, J., Covert, C.D., Van Dingenen, R. (2000) Size distribution and chemical composition of marine aerosols: a compilation and review. *Tellus*. 52B, 1104-1122.
- Herrera-Martínez, S.L., Mora-Herrera, M.E., García-Velasco, R., Gomora-Rasso, J., Rogel-Millán, G. (2013). Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. *Terra Latinoamericana*. 31, 193-199.
- Huff, A. (1982) Peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide. *Phytochemistry*. 21, 261-265.
- Husk, G.J., Weishampel, J.F., Schlesinger, W.H. (2004). Mineral dynamics in spanish moss, *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), from Central Florida, USA. *Science Total Environmental*. 321, 165-172.
- Ianculescu, M. y Budu, C.E. (2008). Detection of resistant individuals to SO<sub>2</sub> pollution by using peroxidase activity regulated by a glycoprotein in sessile oak seedlings (*Quercus Petraea* (Matt.) Liebl.). *Proceedings of the Romanian Academy-Series B*. 1, 101-107.
- INE. (2009). Análisis y síntesis de los resultados de las Campañas MCMA-2003 y MILAGRO-2006 para su uso en la formulación de estrategias en materia de cambio climático y contaminación local en la ZMVM. 1-95

- Issac-Olivé, K., Martínez-Carrillo, M.A., Andrade, E., López, C., Lucho-Constantino, C.A., Beltrán-Hernández, R.I. (2012). *Tillandsia usneoides* L, a biomonitor in the determination of Ce, La y Sm by neuron activation analysis in an industrial corridor in Central Mexico. *Revista Mexicana de Física*. 57, 75-79.
- Jeffrey, S. W. y Humphrey, G. F. (1975). "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167, 191-194.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K. (2009). Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*. 25, 1-11.
- Juda-Rezler, K., Reizer, M., Oudinet, J. P. (2011). Determination and analysis of PM<sub>10</sub> source apportionment during episodes of air pollution in central eastern european urban areas: The case of Winter time 2006. *Atmospheric Environment*. 45, 6557-6566.
- Khan, A., Malhotra, S. (1982). Peroxidase activity as a indicator of SO<sub>2</sub> injury in jack pine and white birch. *Plant Physiology and Biochemistry*. 177, 643-650.
- Kinzel, H. (1989). Calcium in the vacuoles and cell walls of plant tissue. *Flora*. 182, 99-125.
- Klumpp, A., Hintemann, T., Limac, S.J., Kandeler, E. (2003). Bioindication of air pollution effects near a copper smelter in Brazil using mango trees and soil microbiological properties. *Environmental Pollution*. 126, 313-321.
- Korzekwa, S., Pankratova, S.Y., Frontasyeva V.M. (2007). Air pollution studies in Opole region, Poland, using the moss biomonitoring technique and neutron activation analysis. *Proceedings of ECOpole*. 1, 43-51.
- Krishnaveni, M. (2013). Biochemical changes in plants indicating air pollution. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, 585-586.
- Krywult, M., Salachna, A., Chmura, D., Żarnowiec, J. (2013). Nitrate reductase activity in chosen mosses: a case of study in skalny colliery waste tip. *Chemistry Didactics Ecology Metrology*. 18, 61-68.
- Kumar, P.R., Tomar, C., Neelumalviya, Mahajan, S. (2015). Phytomonitoring of atmospheric pollution in road side perennial trees of Indore city (m.p.) India. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*. 7, 1727-1734.
- León, M.J.M., Sepúlveda, J.G. (2012). El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia*. 37, 805-811.
- Li, H.M. (2003). Peroxidase and superoxide dismutase activities in fig Leaves in response to ambient air pollution in a subtropical city. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45, 168-176.

- Li, P., Zheng G., Chen, X., Pemberton, R. (2012). Potential of monitoring nuclides with the epiphyte *Tillandsia usneoides*: Uptake and localization of  $^{133}\text{Cs}$ . *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 86, 60-65.
- Lijteroff, R., Lima, L., Prieri, B. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25, 111-120.
- López, M.A. y Magnitskiy, S. (2011). Nickel: The last of the essential micronutrients. *Agronomía Colombiana* 29, 49-56.
- Mahecha, G.S., Bamniya, B.R., Nai, N., Saini, D. (2013). Air Pollution Tolerance Index of Certain Plant Species-A Study of Madrid Industrial Area, Udaipur (Raj.), India. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2, 7927-7929.
- Malhotra, S.S. y Hocking, D. (1976). Biochemical and cytological effects of sulphur dioxide on plant metabolism. *New Phytology*. 76, 227-237.
- Malick, C.P. y Singh, M.B. (1980). Plant enzymology and histoenzymology. Kalyani Publishers New Delhi. Pp 53.
- Menéndez, M. (2009). Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales. 7004UY Determinación de Clorofila a, b y c1+c2 y Feopigmentos de Clorofila a (feofitina a) encontrados en fito- plancton de agua dulce y marina. Método Espectrofotométrico de extracción con acetona. *DINAMA*. 1-9.
- Malm, O., De Freitas, F.M., Hissnauer, M.P., Rodrigues, B.W., Neves, P.F. (1998). Use epiphyte plants as biomonitors to map atmospheric mercury in a gold trade center city, Amazon, Brazil. *The Science of the Total Environmental*, 213, 57-64.
- Markert, B. (2007). Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21, 77-82.
- Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister H.G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: Markert, B.A., Breure, A.M. Zechmeister, H.G. (Eds) *Bioindicators and Biomonitors*. Oxford. 3-39.
- Martin, C.E., Christensen L.N., Strain, R.B. (1981). Seasonal patterns of growth, tissue acid fluctuations, and  $^{14}\text{CO}_2$  uptake in the crassulacean acid metabolism epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Spanish Moss). *Oecologia*. 49, 322-328.
- Martin, C.E., Rux, G., Herppich, B.W. (2012). Responses of epidermal cell turgor pressure and photosynthetic activity of leaves of the atmospheric epiphyte *Tillandsia usneoides* (Bromeliaceae) after exposure to high humidity. *Journal of Plant Physiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.08.013>.

- Martínez-Carrillo, M.A., Solís, C., Andrade, E., Isaac-Olivé, K., Rocha, M., Murillo, G., Beltrán-Hernández, R.I., Lucho-Constantino, C.A. (2011). PIXE analysis of *Tillandsia usneoides* for air pollution studies at an industrial zone in Central Mexico. *Microchemical Journal*. 21, 1-15.
- Martínez-Reséndiz, G. (2011). Biomonitorio de la calidad del aire en la región minera de Zimapán, Hgo., mediante el uso de *Tillandsia usneoides* L. Tesis de maestría. Zempoala, Hidalgo, México: Universidad Politécnica de Pachuca. 1-101.
- Martínez-Reséndiz, G., (2008). Evaluación de la composición elemental de metales en aerosoles atmosféricos (PM<sub>10</sub>) en la Región Tula-Tepeji, Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Pachuca: Zempoala. p. 51
- McInnis, S.M., Emery, D.C., Porter, R., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J. (2006). The role of stigma peroxidases in flowering plants insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *Journal of Experimental Botany*. 8, 1835-1846.
- Melgar-Paniagua, E.M., Vega-Rangel, E., Del Razo, L.M., Lucho-Constantino, C.A., Rothenberg, S.J., De Vizcaya-Ruiz A. (2012). Distributed lag associations between respiratory illnesses and mortality with suspended particle concentration in Tula, a highly polluted industrial region in Central Mexico. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 12, 1-12.
- Mena-Ulecia, K., Guanche-Gallardo, D., Hernández-Hernández, H. (2010). Marcadores de estrés oxidativo en raíces de *Allium cepa* L. expuestas a las aguas contaminadas del río Cojímar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 41, 189-193.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Soil Science and Plant Nutrition*. 10, 476 - 494
- Mohammed, A.H., Al-Muwayhi, Abdulaziz, A.M., Al Sahli. (2015). Ameliorating Effect of Ascorbic Acid on the Content of Minerals in Eruca Sativa Mill. under Different Air Pollutants. *Journal of Food and Nutrition Sciences. Special Issue: Food Processing and Food Quality*. 3, 161-164.
- Morgan, J.M., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Charles, J.C., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, C.R.T., Schauer, N., Fernie, R.A., Fricker, D.M., Ratcliffe, G.R., Sweetlove, J.J., Finkemeier, I. (2008). Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis *Plant Physiology*. 147, 101-114.

- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas del C.E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: From molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29, 117-140.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö y Kaya, Y. (2009). Effect of cement dust on diversity and antioxidant enzyme activities of plants growing around a cement Factory. *Fresenius Environmental Bulletin*. 18, 1823-1827.
- Nast, W., Mortensen, L., Fischer, K. Fitting, I. (1993). Effects of air pollutants on the growth and antioxidative system of Norway spruce exposed in open-top chambers. *Environmental Pollution*. 80, 85-90.
- Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA1-2010, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Valor normado para la concentración de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. 8 de septiembre de 2010.
- Norma oficial mexicana NOM-023-SSA1-1993. "salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). Valor normado para la concentración de bióxido de nitrógeno (no<sub>2</sub>) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población". 23 de abril de 2003.
- Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993, Salud ambiental. Criterios para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a material particulado. Valor de concentración máxima de material particulado para partículas suspendidas totales PST, partículas menores de 10 micrómetros PM<sub>10</sub> y partículas menores de 2.5 micrómetros PM<sub>2.5</sub> en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población. 20 de agosto de 2014.
- Norma Oficial Mexicana NOM-085-SEMARNAT-2011, Contaminación atmosférica-Niveles máximos permisibles de emisión de los equipos de combustión de calentamiento indirecto y su medición. 2 de febrero de 2012.
- Nyman, B.G. (1986) Industrial air pollution and peroxidase activity in Scots pine needles—two case studies. *European Journal of Forest Pathology*. 16, 139-147.
- Odjegba, V.J. y Fasidi, I.O. (2007). Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. *Revista de Biología Tropical*. 55, 815-823.
- Otero-Paternina, A., Cruz-Casallas, P.E., Velasco-Santamaría, Y.M. (2013). Evaluación del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (chlorellaceae). *Acta Biologica Colombiana*. 18, 87-98.
- Owega, S., Evans, G. J., Jervis, R. E., Tsai, J., Kremer, E., & Tan, P. V. (2003). LAMS, Laser Ablation/Ionization Mass Spectrometry for Aerosol

- Characterization and Source Apportioning. Biomonitoring of atmospheric pollution (with emphasis on trace elements)-*BioMAP II*. 77.
- Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V., Toro, L. (2004). Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: Pollution detection and affinity series. *Environmental Pollution*. 132, 189-201.
- Papini, A., Tani, G., Di Falco, P., Brighigna, L. (2010). The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 205, 94-100.
- Pellegrini, E., Lorenzini, G., Loppi, S., Nali, C. (2014). Evaluation of the suitability of *Tillandsia usneoides* (L.) L. as biomonitor of airborne elements in an urban area of Italy, Mediterranean basin. *Atmospheric Pollution Research*. 5, 226-235.
- Pereira, P.P.H., Sales, P.D., Antunes, F. (2005). Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculata*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40, 727-734.
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*. 32, 112-119.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Plá, R.R., Gonzáles, C.M., Carreras, H.A., Orellana, L. (2002). Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia Capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution*. 120, 59-68.
- Poikolainen, J. (2004). Mosses, epiphytic lichens and tree bark as biomonitors for air pollutants—specifically for heavy metals in regional surveys. Academic Dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Science, University of Oulu, for public discussion in Kuusamonsali.
- Prieto-García, F.; Lucho Constantino, C. A.; Poggi Valardo, H.; Álvarez Suárez, M.; Barrado Esteban, E. (2007). Caracterización fisicoquímica y extracción secuencial de metales y elementos trazas en suelos de la región Actopan-Ixmiquilpan del distrito de riego 03, Valle de Mezquital, Hidalgo, México. *Ciencia Ergo Sum*. 4, 69-80.
- Pukacka, S., Pukacki, M.P. (2000). Seasonal changes in antioxidant level of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles exposed to industrial pollution. I. Ascorbate and thiol content. *Acta Physiologiae Plantarum*. 22, 451-456.
- Putter, J (1974) In: Methods of Enzymatic Analysis 2 (Ed Bergmeyer) Academic Press New York, p 685.
- Pyatt, F.B., Grattan, J.P., Pyatt, A.J., Seaward R.D. (1999). Comparative effectiveness of *Tillandsia usneoides* L. and *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale as bio-indicators of atmospheric pollution in Louisiana. *Water, Air and Soil Pollution*. 111, 317-326.

- Querol, X., Pey J., Minguillón M.C., Pérez N., Alastuey A., Viana M., Moreno T., Bernabé R.M., Blanco S., Cárdenas B., Vega E., Sosa G., Escalona S., Ruiz H., Artiñano (2008). PM speciation and sources in Mexico during the MILAGRO-2006 Campaign. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 8, 111-128.
- Ramírez, C.M., Oviedo, L.J.C., Salazar, M.S., Giraldo, A.W. (2008). Biomonitorio de metales pesados empleando herramientas del SIG en el valle de Aburra. *Revista Investigaciones Aplicadas*. 3, 7-14.
- Ranieri, A., Schenone, G., Lencioni, L., Soldatini, G.F (1994) Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *Journal of Environmental Quality*. 23, 360-364.
- Rivera, C., Sosa, G., Höhrnschimmel, H., De Foy, B., Johansson, M., Galle, B. (2009). Tula industrial complex (Mexico) emission of SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> during the MCMA 2006 field campaign using a Mini-DOAS system. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*. 9, 5153-5176.
- Rodrigues, B.W., De Freitas, F.A., Neves, P.F., De Freitas, R.M., Silva, D.S., Da Silveira, E.G., Machado, T.J.P., Malm, O., Pfeiffer, W.C. (2004). Mercury persistence in indoor environment in the Amazon Region, Brazil. *Environmental Research*. 96, 235-238.
- Rodríguez, D.A. y Guerrero, Z.L.A. (2012). Phenoloxidasas activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 4, 35-40.
- Roholla, M. S., Shahsavari, M., Rezaei, M. (2011). A general overview on manganese (Mn) importance for crops production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 1799-1803.
- Rosas, P.I., Álvarez, C.D.E. (2009). Revisión y sistematización de la literatura nacional e internacional sobre los impactos de la contaminación del aire en cultivos agrícolas y forestales. Informe. Instituto Nacional de Ecología.
- Rubiano, O.J.L., Chaparro, V.M. (2006) Delimitation of atmospheric Iso-contamination areas in the universidad nacional de Colombia campus by analysis of bioindicators (Epiphitic lichens). *Acta biológica Colombiana*. 2, 1-10.
- Sadasivam, S. Manickam, A. (1996). Biochemical Methods. India, New Age International. pp 56.
- Sandu, O.I., Bulgariu, L., Macoveanu, M. (2012). Evaluation of environmental impact using active biomonitoring studies of air pollution. *Environmental Engineering and Management Journal*. 11, 1527-1534.
- Scatena, V.L., Segecin, S. (2005). Anatomía foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 3, 635-649.

- Schützendübel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Experimental Botany*. 53, 1351-1365.
- SEMARNAT (2009) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Inventario de emisiones de la Región Tula–Tepejl, 2005.
- Servicio Geológico Mexicano. (2014). Panorama minero del estado de Hidalgo. Secretaría de Economía. 1-53.
- Setter, L.T., Brud, A.W., Brenner L.M. (1980). Effect of obstructed translocation on leaf abscisic acid, and associated stomatal closure and photosynthesis decline. *Plant Physiology*. 65, 1111-1115.
- Shafiqur, R.K., Robin, R.D., Thomas, E.S. (2000). Effects of shade on morphology, chlorophyll concentration and chlorophyll fluorescence of four Pacific Northwest conifer species. *New Forests*. 19, 171–186.
- Sharma, P., Bushan, J.A., Shanker, D.R., Passarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damages and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. 1-26.
- Shaw, B. P., Sahu, S.K. y Mishra, R. K. (2004). Heavy metals induced oxidative damage in terrestrial plants. Heavy metals stress in plants. M. N. V. Prasad. Hyderabad, Springer: 462.
- Smodis, B., Parr, R.M. (1999) Biomonitoring of air pollution as exemplified by recent IAEA programs. *Biological Trace Element Research*. 71, 257-66.
- Soukupová, J., Cvikrová, M., Albrechtová, J., Rock, N.B., Eder, J. (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytology*. 146, 403-414.
- Stefano, M., Papini, A., Brighigna, L. (2008). A new quantitative classification of ecological types in the bromeliad genus *Tillandsia* (Bromeliaceae) based on trichomes. *Review of Biology*. 56, 191-203.
- Szczepaniak K., Biziuk M. (2003). Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environmental Research*. 93, 221-230.
- Tanaka, K., Sugahara, K. (1980). Role of superoxide dismutase in defense against SO<sub>2</sub> toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO<sub>2</sub> fumigation. *Plant Cell Physiology*. 21, 601-611.
- Thawale, P.R., Satheesh, B.S., Wakode, R.R., Singh, S.K., Kumar, S., Juwarkar, A.A. (2011). Biochemical changes in plant leaves as a biomarker of pollution due to anthropogenic activity. *Environmental Monitoring and Assessment*. 177, 527-35.
- Thomas, U., Lineham, Jr. (1986). Journal of the bromeliad society. *Sociedad de Bromelias*. 36, 149-167.

- Thompson, J.R., Mueller, P.W., Flückiger†, W., Rutter, A.J. (1984). The effect of dust on photosynthesis and its significance for roadside plants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 34, 171-190
- Turtós, I., Meneses, E., Díaz, N. (2003). Dispersión local de contaminantes atmosféricos producto de la generación eléctrica. Caso de estudio: Central termoeléctrica Carlos Manuel de Céspedes de Cienfuegos. La Habana: Centro de Gestión de la Información y Desarrollo de la Energía.
- USEPA, [Environmental Protection Agency] (2010): Microwave assisted digestion of siliceous and organically based matrices. Fecha de acceso: 5 de noviembre de 2010. Disponible en: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3052.pdf>.
- Valdez, S.I. (2012). Evaluación de parámetros bioquímicos en *Tillandsia* spp. por la exposición a contaminantes atmosféricos en la región industrial Tula-Tepeji. Tesis de maestría. Zempoala, Hidalgo, México: Universidad Politécnica de Pachuca. 1-90.
- Valenta, P., Nguyen, V., Nornberg, H. (1986). Acid and heavy metal pollution by wet deposition. *Science of the Total Environment*. 55, 311-320.
- Varshney, S., Varshney, C. (1985). Response of peroxidase to low levels of SO<sub>2</sub>. *Environmental and Experimental Botany*,. 25, 107-114.
- Verma, V., Chandra, N. (2014). Biochemical and ultrastructural changes in *Sida cordiflora* L. to auto pollution. *International Scholarly Research Notices*. 2014, 1-11.
- Viana, M., Pandolfi, M., Minguillón, C.M., Querol, X., Alastuey, A., Monfort E., Celades, I. (2008). Inter-comparison of receptor models for PM source apportionment: Case study in an industrial area. *Atmospheric Environment*. 42, 3820-3832.
- Viorel, O.M., Tutu, E., Ioana, S.C., Ciornea, E. (2013). Some aspects of antioxidant defense mechanisms in Wood species exposed to anthropic pollution in Suceava county. *Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*. 14, 1-6.
- Wagner, J.G., Wang, E., Shepherd, W.R. (2004). New Approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*. 93, 3-11.
- Wannaz, E., Pignata, M. (2006). Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 53, 185-209.
- Wansoh, K., Beem, C.N., Techato, K. (2014). The study of the heavy metal adsorption to absorption ratio in the Spanish moss (*Tillandsia usneoides* L.) around gas separation Factory. *Science, Technology and Innovation for ASEAN Green Growth*. 503-505.
- WHO, World Health Organization (2006). Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. World Health Organization. Switzerland. 22.

- Wichmann-Fiebig, M. (2005). Contaminación atmosférica: modelos de dispersión de contaminantes atmosféricos. Control de la contaminación ambiental. pp. 23-27. En <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/55.pdf> consultado el 31 de diciembre de 2014
- Wiese, C.B., Pell, E.J. (2004). Efectos de la contaminación del aire sobre las plantas: de las células a los ecosistemas. La eco fisiología vegetal. Una ciencia de síntesis. Thomson. Colombia. 7-249.
- Yang, X., Baligar, V. C., Martens, D. C., Clark, R. B. (1996). Plant tolerance to nickel toxicity: ii nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *Journal of Plant Nutrition*. 19, 265-279.
- Yllanes, P., Vélez-Azañero, A., Lozano, S. (1994). Phytotoxic effects of lead on dekalb hybrid maize (*Zea mays* l.) In sandy and silty soil. *The Biologist*. 12, 337-348.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. Brazil. *Journal Plant Physiology*. 17, 145-156.
- Zambrano G.A., Medina, C.A., Rojas, López, V.D., Chang, M.L, Sosa, I.G. (2009). Distribution and sources of bioaccumulative air pollutants at Mezquital Valley, Mexico, as reflected by the atmospheric plant *Tillandsia recurvata* L. *Atmospheric Chemistry Physics*. 9, 6479-6494.
- Zambrano, A., Medina, C., Rojas, A., Lopez, D., Sosa, G., Chang, L. (2009). Distribution and sources of bioaccumulative air pollutants at Mezquital Valley, Mexico, as reflected by the atmospheric plant *Tillandsia recurvata* L. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 9, 6479-6494.

#### Páginas web

- <http://www.nap.edu/catalog/1414.html> consultado el 14 de enero de 2014.
- <http://mexico.pueblosamerica.com/i/bella-vista-24/>
- <http://intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13072a.htm>

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Dispersión de contaminantes en la zona de estudio.

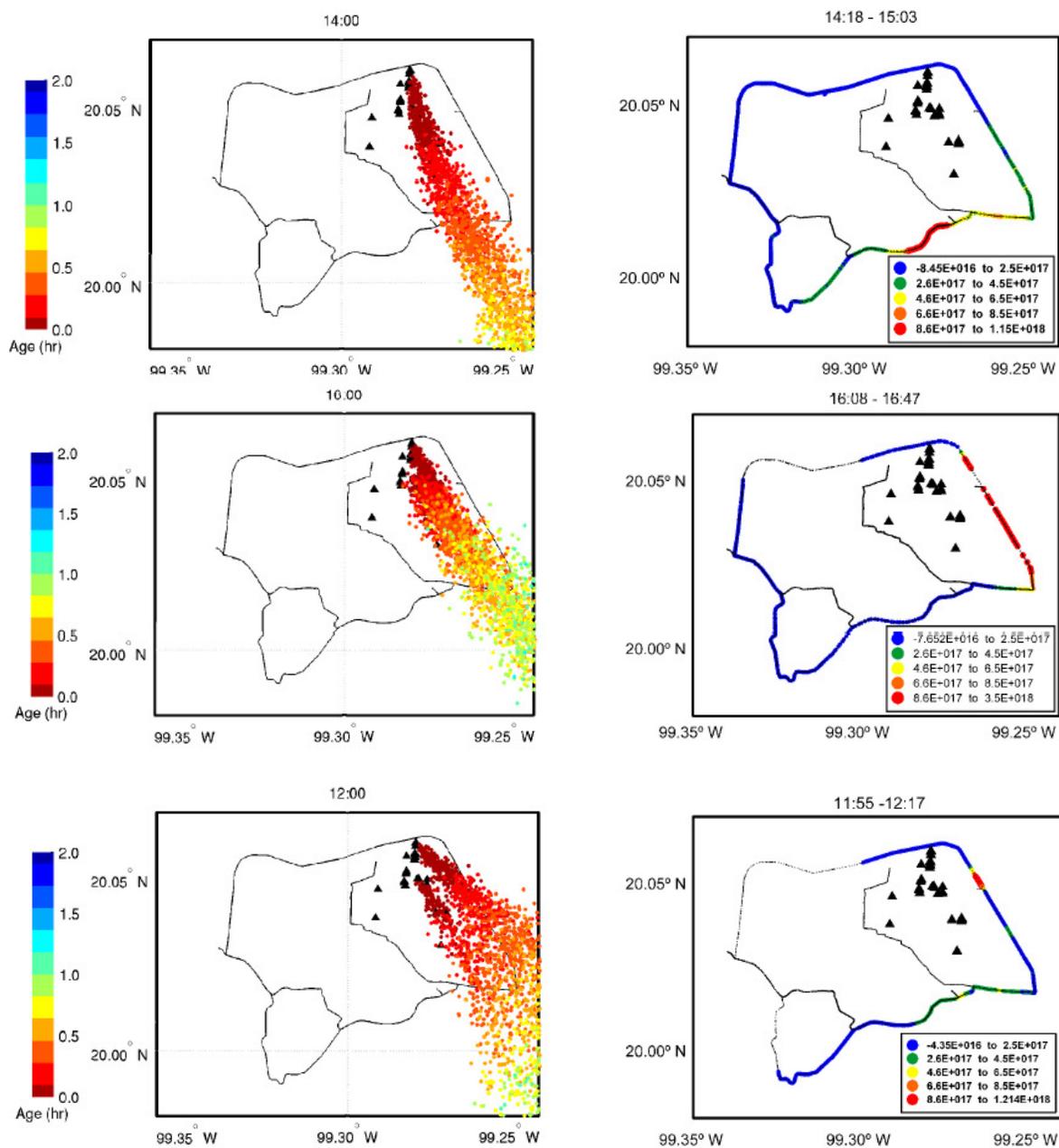


Figura 35. Dispersión de contaminantes desde el sitio emisor.

Tomado de De Foy *et al.*, 2007.

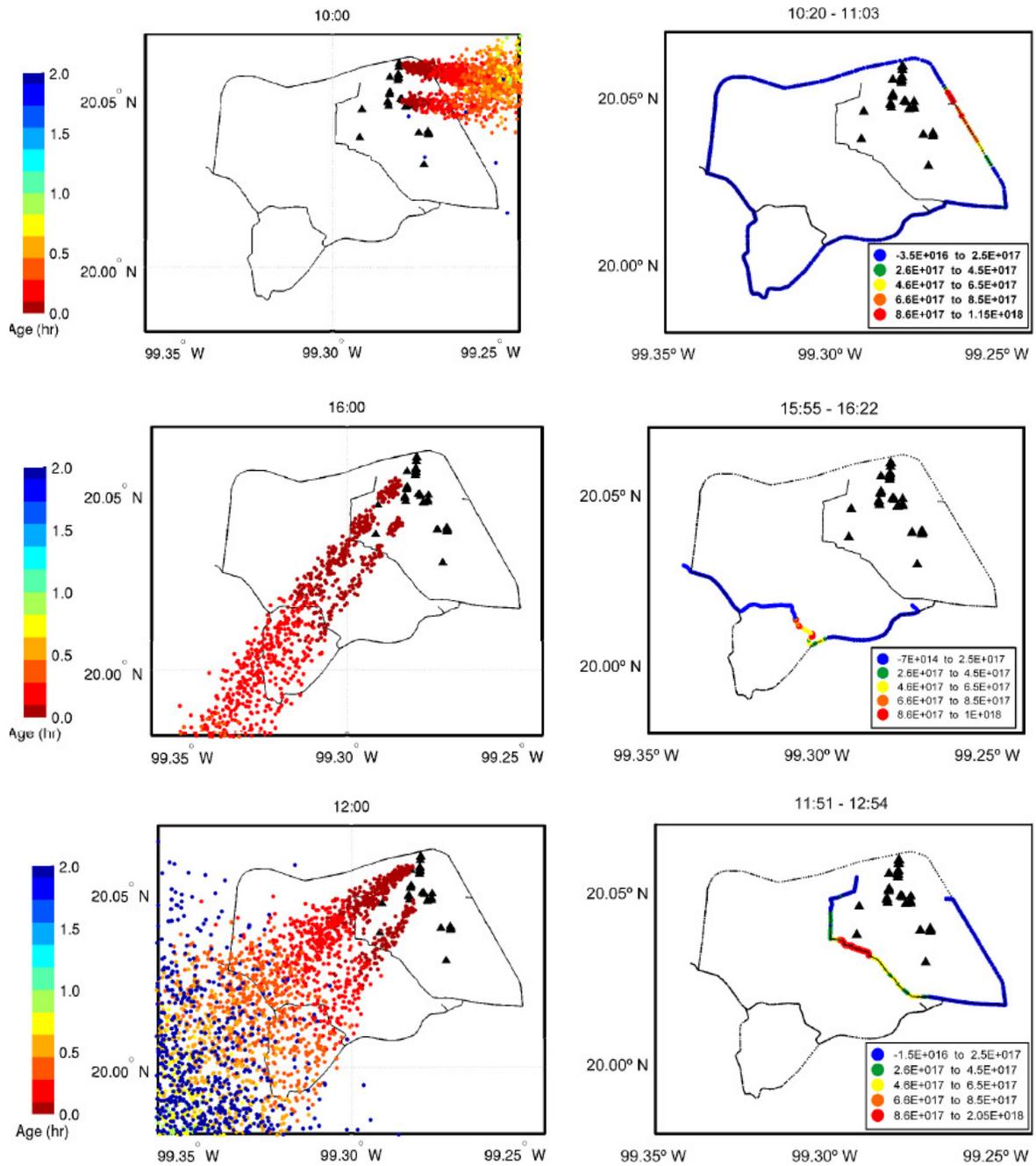


Figura 36. Dispersión de contaminantes del sitio emisor (Atitalaquia).

Tomado De Foy *et al.*, 2007.

Anexo 2.



(a)



(b)

Figura 37. Muestra de planta sin viabilidad, a) experimento 1 y b) experimento 2.



Figura 38. Muestra de planta del experimento 2 con viabilidad.

Anexo 3. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor.

Tabla 10. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Actopan en el experimento 1.

	Cloa	Clob	Proteína	aa	POD	NR	SOD	TCu	TPb	TZn	TMn	TMg	TFe	TCa
<b>Cloa</b>	1	<b>0.862*</b>	-0.472	<b>0.898*</b>	0.509	0.092	0.871	0.236	<b>0.890*</b>	0.699	0.218	<b>0.889*</b>	0.643	<b>0.845*</b>
<b>Clob</b>		1	<b>-0.841*</b>	<b>0.996**</b>	0.404	0.269	<b>0.989**</b>	0.406	<b>0.992**</b>	0.760	0.073	<b>0.993**</b>	0.495	<b>0.987**</b>
<b>Proteína</b>			1	-0.793	-0.242	-0.549	-0.801	-0.466	<b>-0.814*</b>	-0.607	0.121	<b>-0.817*</b>	-0.303	<b>-0.869*</b>
<b>aa</b>				1	0.410	0.217	<b>0.987**</b>	0.358	<b>0.994**</b>	0.748	0.077	<b>0.994**</b>	0.520	<b>0.979**</b>
<b>POD</b>					1	0.266	0.624	0.418	0.460	<b>0.825*</b>	0.773	0.459	<b>0.845*</b>	0.421
<b>NR</b>						1	0.343	0.444	0.287	0.295	-0.080	0.292	0.315	0.406
<b>SOD</b>							1	<b>0.895*</b>	<b>0.996**</b>	<b>0.959*</b>	0.611	<b>0.996**</b>	0.519	<b>0.993**</b>
<b>TCu</b>								1	0.340	0.723	0.597	0.345	0.012	0.402
<b>TPb</b>									1	0.757	0.072	<b>1.000**</b>	0.591	<b>0.989**</b>
<b>TZn</b>										1	0.677	0.758	0.614	0.743
<b>TMn</b>											1	0.072	0.346	0.026
<b>TMg</b>												1	0.588	<b>0.990**</b>
<b>TFe</b>													1	0.546
<b>TCa</b>														1

\*La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

\*\*La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

Cloa: Clorofila a

Clob: Clorofila b

aa: ácido ascórbico

T: elementos en *Tillandsia usneoides*

Tabla 11. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Tlaxcoapan en el experimento 1.

	Cloa	Clob	Proteína	aa	POD	NR	SOD	TCu	TPb	TZn	TMn	TMg	TFe	TCa
<b>Cloa</b>	1	0.773	-0.127	0.745	0.718	0.205	-0.577	0.745	0.739	0.743	-0.558	0.731	-0.767	0.726
<b>Clob</b>		1	-0.674	<b>0.986*</b>	<b>0.815*</b>	0.626	-0.516	<b>0.992**</b>	<b>0.988**</b>	<b>0.992**</b>	<b>-0.945**</b>	<b>0.987**</b>	<b>-0.980**</b>	<b>0.989**</b>
<b>Proteína</b>			1	-0.737	-0.372	<b>-0.814*</b>	0.042	-0.736	-0.745	-0.734	<b>0.859*</b>	-0.752	0.727	-0.759
<b>aa</b>				1	.734	0.658	-0.401	<b>0.998**</b>	<b>0.999**</b>	<b>0.999**</b>	<b>-0.957**</b>	<b>0.999**</b>	<b>-0.997**</b>	<b>0.995**</b>
<b>POD</b>					1	0.229	<b>-0.911*</b>	0.764	0.755	0.754	-0.658	0.738	-0.737	0.760
<b>NR</b>						1	0.065	0.662	0.659	0.663	<b>-0.819*</b>	0.675	-0.654	0.692
<b>SOD</b>							1	-0.442	-0.430	-0.427	0.313	-0.405	0.414	-0.441
<b>TCu</b>								1	<b>1.000**</b>	<b>1.000**</b>	<b>-0.961**</b>	<b>0.999**</b>	<b>-0.996**</b>	<b>0.999**</b>
<b>TPb</b>									1	<b>0.999**</b>	<b>-0.961**</b>	<b>1.000**</b>	<b>-0.997**</b>	<b>0.998**</b>
<b>TZn</b>										1	<b>-0.962**</b>	<b>0.999**</b>	<b>-0.995**</b>	<b>0.997**</b>
<b>TMn</b>											1	<b>-0.965**</b>	<b>0.947**</b>	<b>-0.970**</b>
<b>TMg</b>												1	<b>-0.996**</b>	<b>0.998**</b>
<b>TFe</b>													1	<b>-0.994**</b>
<b>TCa</b>														1

\*La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

\*\*La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

Cloa: Clorofila a

Clob: Clorofila b

aa: ácido ascórbico

T: elementos en *Tillandsia usneoides*

Tabla 12. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Actopan durante el experimento 2.

	Cloa	Clob	Proteína	aa	POD	NR	SOD	TPb	TMn	TFe	TZn	TCu	TMg	TCa	MPMn	MPZn	MPCu	MPMg	MPFe	MPPb	MPCa	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>
Cloa	1	<b>0.959**</b>	0.195	-0.224	0.247	<b>-0.493**</b>	0.09	0.297	-0.272	-0.155	0.327	0.355	-0.075	<b>-0.437*</b>	0.297	0.029	-0.251	-0.156	-0.112	0.366	0.183	<b>-0.368*</b>	-0.022
Clob		1	0.265	-0.145	0.214	<b>-0.608**</b>	0.152	0.332	-0.173	-0.176	<b>0.467**</b>	<b>0.505**</b>	0.012	-0.284	0.371	0.154	-0.185	-0.156	-0.043	0.315	0.277	<b>-0.378*</b>	-0.039
Proteína			1	<b>-0.468**</b>	<b>-0.586*</b>	<b>-0.574**</b>	0.294	-0.001	0.061	<b>0.601**</b>	<b>0.467**</b>	<b>0.462*</b>	-0.154	0.051	0.225	-0.181	-0.138	-0.287	-0.029	-0.204	-0.099	-0.091	<b>0.575**</b>
aa				1	<b>0.622**</b>	-0.071	-0.343	0.076	<b>0.385*</b>	<b>-0.611**</b>	0.131	0.176	<b>0.514**</b>	<b>0.469**</b>	-0.363	<b>0.646**</b>	<b>0.455*</b>	-0.025	-0.216	-0.204	<b>0.607**</b>	-0.11	<b>-0.630**</b>
POD					1	0.086	-0.279	0.079	0.108	<b>-0.647**</b>	-0.191	-0.148	0.316	0.216	0.138	0.383	0.341	0.171	0.166	<b>0.687**</b>	0.3	-0.028	<b>-0.686**</b>
NR						1	-0.099	-0.076	-0.177	0.097	<b>-0.579**</b>	<b>-0.660**</b>	-0.215	-0.166	<b>-0.486*</b>	<b>-0.401*</b>	-0.191	0.274	0.103	-0.139	<b>-0.455*</b>	<b>0.571**</b>	-0.112
SOD							1	0.175	0.009	0.275	0.299	0.288	-0.08	0.221	-0.113	-0.293	<b>-0.400*</b>	0.199	-0.057	-0.205	-0.297	0.306	0.133
TPb								1	<b>-0.365*</b>	0.016	<b>0.575**</b>	<b>0.542**</b>	-0.076	-0.304	0.004	0.163	-0.081	-0.211	0.146	0.087	0.331	0.009	-0.163
TMn									1	-0.086	0.099	0.137	<b>0.826**</b>	<b>0.546**</b>	-0.021	0.296	0.308	0.198	0.083	<b>-0.456*</b>	0.077	0.261	-0.139
TFe										1	0.126	0.047	<b>-0.386*</b>	-0.173	-0.039	<b>-0.565**</b>	-0.171	-0.233	0.05	<b>-0.463*</b>	<b>-0.502**</b>	0.275	<b>0.499**</b>
TZn											1	<b>0.992**</b>	0.177	0.137	0.039	0.285	-0.01	-0.39	-0.137	-0.181	<b>0.412*</b>	-0.211	0.044
TCu												1	0.223	0.178	0.097	0.354	0.036	-0.38	-0.123	-0.155	<b>0.460*</b>	-0.272	0.024
TMg													1	0.308	-0.115	<b>0.483**</b>	0.296	0.336	0.332	-0.225	<b>0.435*</b>	0.179	-0.358
TCa														1	-0.067	0.331	0.286	0.12	0.018	<b>-0.436*</b>	0.002	0.133	-0.077
MPMn															1	<b>0.641**</b>	-0.063	-0.215	0.332	0.397	0.139	-0.375	-0.131
MPZn																1	0.3	-0.198	<b>0.606**</b>	0.218	<b>0.675**</b>	<b>-0.400*</b>	<b>-0.452*</b>
MPCu																	1	0.195	0.147	-0.211	0.287	-0.219	-0.011
MPMg																		1	0.345	-0.289	-0.313	0.185	0.024
MPFe																			1	-0.04	-0.028	0.073	0.202
MPPb																				1	<b>0.443*</b>	-0.204	-0.151
MPCa																					1	<b>-0.415*</b>	-0.323
NO <sub>2</sub>																						1	-0.029
SO <sub>2</sub>																							1

\*La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

\*\*La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

Cloa: Clorofila a

Clob: Clorofila b

aa: ácido ascórbico

T: *Tillandsia usneoides*

MP: Material Particulado

Tabla 13. Correlaciones entre los contaminantes y los parámetros biológicos en el biomonitor en Tlaxcoapan durante el experimento 2.

	Cloa	Clob	Proteína	aa	POD	NR	SOD	BPb	BMn	BFe	BZn	BCu	BMg	BCa	Mn	FZnLg	Fcu	FMg	Ffe	FPb	Fca	NO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>
Cloa	1	<b>0.967**</b>	<b>-0.463**</b>	<b>0.781**</b>	-0.256	<b>-0.567*</b>	-0.185	-0.057	0.121	0.136	0.349	<b>0.561**</b>	-0.026	-0.073	0.068	-0.304	<b>-0.418*</b>	-0.248	0.147	<b>-0.477*</b>	0.191	-0.128	0.158
Clob		1	<b>-0.456*</b>	<b>-0.692**</b>	-0.238	<b>-0.581*</b>	-0.207	-0.08	0.144	-0.202	<b>0.432*</b>	<b>-0.468**</b>	0.043	0.068	0.108	-0.237	-0.369	-0.274	0.269	<b>-0.527**</b>	0.233	-0.082	0.122
Proteína			1	<b>0.536**</b>	0.01	-0.162	<b>-0.517**</b>	<b>-0.496**</b>	-0.024	0.067	<b>-0.595**</b>	<b>0.546**</b>	0.189	-0.012	0.056	-0.039	<b>0.472*</b>	<b>0.511*</b>	-0.22	<b>0.762**</b>	<b>-0.493*</b>	0.055	-0.055
aa				1	<b>0.395*</b>	-0.104	-0.136	-0.229	-0.046	0.011	-0.292	<b>0.872**</b>	0.168	0.318	0.032	<b>0.467*</b>	<b>0.535**</b>	0.285	0.105	<b>0.560**</b>	-0.162	0.039	-0.23
POD					1	-0.424	0.178	-0.075	0.12	0.162	-0.236	<b>0.476**</b>	0.142	0.246	0.143	0.393	-0.078	0.025	0.222	0.356	0.083	0.094	-0.094
NR						1	<b>0.469*</b>	<b>0.602**</b>	-0.164	-0.1	-0.385	<b>-0.814**</b>	<b>-0.514*</b>	<b>-0.916**</b>	-0.296	0.327	0.11	-0.314	<b>0.841**</b>	0.005	-0.376	-0.029	-0.169
SOD							1	<b>0.594**</b>	0.117	0.242	0.08	-0.294	-0.153	-0.124	0.035	0.362	<b>-0.416*</b>	-0.247	-0.199	-0.271	0.067	0.147	-0.239
TPb								1	-0.02	-0.316	<b>0.444*</b>	<b>-0.455*</b>	<b>-0.391*</b>	-0.158	-0.152	-0.053	-0.258	<b>-0.592**</b>	-0.141	<b>-0.486*</b>	0.205	-0.039	-0.248
TMn									1	-0.007	0.153	0.077	<b>0.749**</b>	0.263	<b>0.972**</b>	-0.021	-0.231	-0.308	0.203	-0.236	0.078	<b>0.388*</b>	-0.217
TFe										1	<b>-0.383*</b>	0.023	-0.054	-0.123	-0.011	0.065	-0.254	<b>0.430*</b>	-0.23	0.218	-0.229	0.1	-0.14
TZn											1	-0.28	0.116	<b>0.425*</b>	0.139	-0.133	-0.324	<b>-0.704**</b>	<b>0.527**</b>	<b>-0.645**</b>	<b>0.449*</b>	0.05	0.136
TCu												1	<b>0.371*</b>	<b>0.580**</b>	0.191	<b>0.467*</b>	<b>0.524**</b>	<b>0.418*</b>	0.347	<b>0.649**</b>	-0.245	0.128	-0.157
TMg													1	<b>0.552**</b>	<b>0.882**</b>	0.06	-0.163	0.2	<b>0.431*</b>	0.151	-0.139	<b>0.452*</b>	0.074
TCa														1	<b>0.380*</b>	0.256	-0.313	<b>-0.467*</b>	<b>0.777**</b>	-0.308	0.145	0.211	-0.038
TMn															1	-0.013	-0.241	-0.284	0.29	-0.218	0.056	<b>0.441*</b>	-0.134
TZn																1	0.2	-0.016	-0.021	0.29	0.011	-0.078	-0.167
MPCu																	1	0.325	-0.079	0.373	0.035	-0.135	-0.094
MPMg																		1	-0.238	<b>0.411*</b>	-0.173	-0.076	-0.303
MPFe																			1	<b>-0.417*</b>	<b>0.990**</b>	0.072	0.108
MPPb																				1	-0.34	-0.26	0.106
MPca																					1	-0.18	0.149
NO <sub>2</sub>																						1	-0.18
SO <sub>2</sub>																							1

\*La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

\*\*La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

Cloa: Clorofila a

Clob: Clorofila

aa: ácido ascórbico

T: *Tillandsia usneoides*

MP: Material Particulado