



Evaluación de biomarcadores en *tillandsia usneoides* para la detección de contaminantes atmosféricos

Georgina Martínez-Reséndiz¹, Carlos Alexander Lucho-Constantino², Gabriela Alejandra Vázquez-Rodríguez²,
Claudia Coronel-Olivares², Luis Felipe Juárez-Santillán¹, Rosa Isela Beltrán-Hernández^{2*}

¹Área de Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Carr. Gutiérrez Zamora-Boca de Lima
Km 2.5, Gutiérrez Zamora 07360, México.

²Área Académica de Química, Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Mineral de la Reforma 42184, Pachuca, México.

*Autor de correspondencia: mtzresendiz@hotmail.com

Recibido 19 de mayo de 2020; aceptado 25 de junio de 2020

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar, mediante un biomonitoreo activo con *tillandsia usneoides*, la utilidad de los siguientes parámetros biológicos: clorofila, ácido ascórbico, proteínas, actividad peroxidasa (POD), actividad superóxido dismutasa (SOD) y actividad nitrato reductasa (NR) como biomarcadores de efecto por la acumulación de elementos químicos presentes en la atmósfera. El estudio se llevó a cabo en Tlaxcoapan, sitio receptor de contaminantes atmosféricos provenientes del corredor industrial Tula-Vito-Apasco (TVA) y en Actopan, como sitio control. El experimento fue realizado de febrero a octubre de 2012. 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. 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. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que confirmen lo anterior y que delimiten el intervalo de concentraciones en que podrían ser empleados.

PALABRAS CLAVE: Biomonitor, biomarcadores, contaminación del aire, *tillandsia usneoides*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine, through an active biomonitoring with *tillandsia usneoides*, the usefulness of the following biological parameters: chlorophyll, ascorbic acid, proteins, peroxidase activity (POD), nitrate reductase activity (NR) and superoxide dismutase activity (SOD) as effect biomarkers by the accumulation of chemical elements present in the atmosphere. This study was performed in Tlaxcoapan, as a receptor site for atmospheric pollutants from the Tula-Vito-Aspasco (TVA) industrial corridor, and Actopan, as a control site. The experiment was undertaken from February to October 2012. The biological parameters mentioned above were evaluated, as well as the concentrations of Ca, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb and Zn on the biomonitor. The results confirmed that Ca and Pb are suitable as exposure biomarkers in *T. usneoides*. Biomarkers of effect such as: chlorophylls, POD activity and ascorbic acid were the parameters that showed potential to be considered as such. However, further studies are needed to confirm the above and to define the range of concentrations in which they could be used.

KEY WORDS: Biomonitor, biomarkers, air pollution, *tillandsia usneoides*

INTRODUCCIÓN

En el campo de las ciencias ambientales, los biomarcadores son expresiones bioquímicas, celulares, fisiológicas 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 también se han comenzado a evaluar biomarcadores en ellas. Esta información toxicológica complementa la que provee el monitoreo físico convencional (Mena et al., 2010). Por ello, la observación o análisis de la contaminación del aire mediante el uso de biomonitores se sugiere 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. (figura 1) 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, *tillandsia usneoides* L., ha sido empleada en diversas partes del mundo como modelo biológico para la medición de contaminantes atmosféricos como elementos químicos (Martínez et al., 2011; Martínez, 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 *tillandsia usneoides*, los biomarcadores de efecto que se correlacionan con la acumulación de elementos químicos presentes en la atmósfera emitidos por las industrias asentadas en el corredor tula-vito-apasco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los experimentos se trabajó en cuatro sitios de estudio como se comenta a continuación. Sitio basal fue el lugar donde se colectaron los ejemplares de *tillandsia usneoides* que se emplearon en el experimento. Se localiza fuera del área de influencia de la pluma de dispersión de contaminantes del sitio emisor. Bella Vista se ubica al sur del estado de Hidalgo (20°59'28.86" N, 98°58'29.00" O). Sitio control: el municipio de Actopan, Hidalgo. Se escogió como sitio control por encontrarse fuera del área de influencia de la pluma contaminante. Sitio emisor fue el corredor

industrial tula-vito-apasco (TVA), donde se ubican tres parques industriales: Tula, Tepeji y Atitalaquia (SEMARNAT, 2009). Sitio receptor, el municipio de Tlaxcoapan, Hidalgo. Se eligió como sitio receptor de alta exposición por encontrarse a 7 km lineales al noreste del corredor industrial TVA, lo que lo ubica dentro del radio de 25 km la pluma de contaminantes (De Foy et al., 2007).

Exposición del material

Cuatro kilogramos de *tillandsia usneoides* fueron expuestos durante 8 meses (febrero a octubre de 2012.). 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 antes de ser expuestas.

Determinación de los biomarcadores de exposición.

Digestión ácida

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. Se pesaron 0.2 g de la muestra y se colocaron en un vaso de digestión al que se adicionaron 10 mL de HNO₃ concentrado. La digestión se realizó de acuerdo al protocolo método 3052 (USEPA,

2010). Terminada la digestión cada muestra se aforó a 50 mL con HNO₃ al 3% y se guardaron en frascos de plástico, previamente lavados con HNO₃ al 3%.

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⁻¹ peso seco.

Cuantificación de clorofila a

Se realizó espectrofotométricamente empleando acetona como extractante (Menéndez, 2009); se pesaron 0.2 g de cada muestra, la cual se maceró en un mortero con 10 mL de acetona. Los extractos recuperados se almacenaron en frascos de vidrio en total oscuridad dentro del refrigerador (3° C) durante un día; 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). Para la cuantificación de la concentración de la clorofila a y b, se utilizó la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975).

Procedimiento general para la obtención de extracto vegetal para las determinaciones de proteínas, y actividades enzimáticas

Se pesaron 0.2 g de muestra de *tillandsia usneoides* 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 12000 rpm durante 15 minutos.

Cuantificación de proteína

Se transfirieron a un tubo de 500 µL del extracto obtenido; a cada tubo se le agregaron 500 µL 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).

Actividad peroxidasa (POD)

En una celda de 1 cm², se colocaron 820 µL de solución de Tris-HCl (pH 7.5) (a 25°C), 50 µL de solución de guayacol, 100 µL de extracto del extracto obtenido y 30 µL de solución de peróxido de hidrógeno. Enseguida se midió la absorbancia a 436 nm en un espectrofotómetro (thermo scientific, genesys 10 vis, E.U.A), utilizando como blanco la mezcla reactiva sin extracto enzimático (Puter, 1974; Malik et al., 1980).

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. 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 et al., 1996).

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; se empleó un blanco con los mismos reactivos, excepto el extracto. 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 naftiletildiamina al 0.02%. Se esperaron 30 minutos para medir la absorbancia a 540 nm (Sadasivam et al., 1996).

Ácido ascórbico

Para la obtención del extracto se trituraron 0.2 g de *tillandsia 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 µL de esta solución y se transfirieron a otro tubo, a los cuales se le adicionaron 950 µL 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 h. 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 et al., 1996).

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 con ayuda del software SPSS, versión 19 de la compañía SPSS Inc., Chicago, IL, USA.



Figura 1. *Tillandsia usneoides*.

RESULTADOS

Elementos contenidos en el biomonitor

Plomo. En la figura 2a 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 mg kg^{-1}) que en Actopan (2.5 mg kg^{-1}). Los datos anteriores confirman la utilidad que tiene *tillandsia usneoides* como biomonitor de Pb en la atmósfera, dado el amplio rango de concentraciones en que lo puede retener. Martínez Carrillo et al. (2010) encontraron este mismo comportamiento de *tillandsia usneoides* con respecto al plomo. Dentro de las principales fuentes de plomo atmosférico, están el tráfico vehicular, las plantas

generadoras de energía eléctrica y los incineradores de residuos (Carballeira et al., 2002). En el corredor industrial TVA existe considerable tráfico vehicular y dos plantas generadoras de energía.

Cobre. La concentración inicial de cobre fue de 52.5 mg kg^{-1} , y al final, en Actopan, fue ligeramente superior (55.08 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 2b). Al igual que en el caso del Pb, es evidente que *tillandsia usneoides* retiene Cu en un amplio rango de concentraciones; 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.

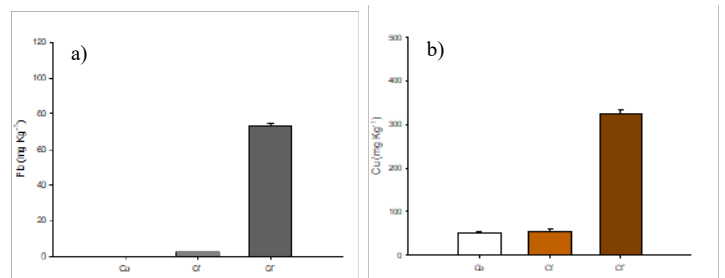


Figura 2a. Concentración de Pb en el biomonitor. **Figura 2b** Concentración de Cu. Co: concentración inicial, Cf y Cf':

concentración final en Actopan y Tlaxcoapan.

Manganeso. 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. El Mn es un micronutriente importante para las plantas, se trata 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).

Zinc. 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 3a). 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.

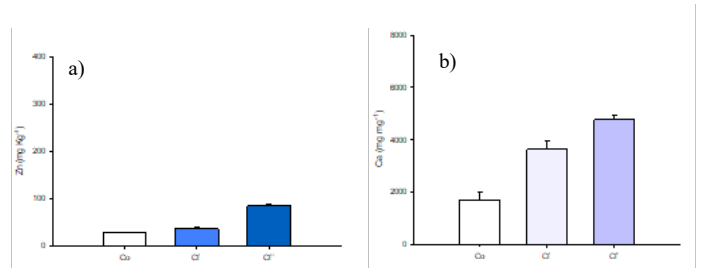


Figura 3a. Concentración de Pb en el biomonitor. **Figura 3b** Concentración de Ca. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan.

Magnesio. 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).

Calcio. Es el elemento que mayor acumulación tuvo en el biomonitor (figura 3b), en Tlaxcoapan mostró una acumulación tres 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.

Hierro. La concentración fue de 1014.15 ± 114.15 mg kg^{-1} . Después de la exposición, en Actopan se mostró un ligero aumento (1100.86 ± 72.86 mg kg^{-1}), mientras que en Tlaxcoapan se observó un decremento (921.74 ± 7.18 mg kg^{-1}).

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.

Expresión de biomarcadores en el biomonitor y la correlación con los elementos acumulados

Clorofila. En ambos sitios de estudio, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la producción de clorofila 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 4a). El mayor incremento se presentó en la clorofila total (43% en Actopan y 20% en Tlaxcoapan). 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.

Proteínas. En este experimento, el contenido de proteínas disminuyó prácticamente en la misma proporción en ambos sitios (17% en Actopan y 16% en Tlaxcoapan) (figura 5a). 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.

Actividad POD. En Actopan, 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 ($p < 0.05$). 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.

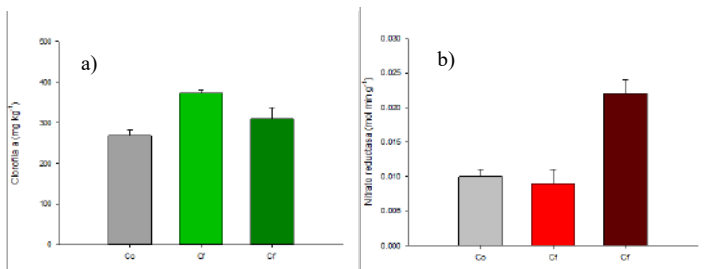


Figura 4a. Concentración de clorofila. **Figura 4b.** Concentración de nitrato reductasa. Co: concentración inicial, Cf y Cf': concentración final en Actopan y Tlaxcoapan.

Actividad super oxido dismutasa (SOD). La actividad SOD fue prácticamente la misma al inicio que al final del experimento (9.12 ± 0.06 a $10.00 \pm 0.00 \text{ U g}^{-1}$).

Actividad nitrato reductasa (NR). 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; no obstante, es válido suponer que existió la concentración suficiente de NO_2 para inducir la acción de la NR en el biomonitor, de acuerdo al mecanismo que se comenta a continuación. Los 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 NO_3^- , sustrato inductor de la NR. También es posible que los NO_x se depositen sobre la superficie foliar, donde reaccionan con el agua para formar NO_3^- , que pueden ser asimilados por la planta (Rosas et al., 2009). En este experimento, la actividad de la NR disminuyó ligeramente en el biomonitor expuesto en Actopan con respecto a la inicial ($0.010 \text{ mol min g}^{-1}$) (figura 4b).

Ácido ascórbico. En la figura 5b se observa que el contenido de ácido ascórbico 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 ($848 \mu\text{g g}^{-1}$) ($p < 0.05$).

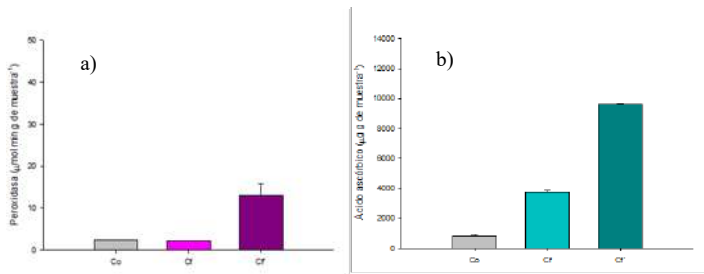


Figura 5a. Concentración de proteínas en el biomonitor.

Figura 5b. Concentración de ácido ascórbico, Co: concentración inicial y Cf: concentración final en Actopan y Tlaxcoapan.

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, $p \leq 0.01$). 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 *tillandsia usneoides* se incrementó como respuesta a la presencia de Ca, Cu, Fe, Mn y Pb en las concentraciones encontradas en los sitios de estudio.

CONCLUSIONES

En este estudio, se corroboró la utilidad de *tillandsia usneoides* para reflejar cambios ante la presencia de algunos contaminantes atmosféricos en un amplio rango de concentraciones. Asimismo, se confirmó la capacidad de acumulación de Ca y Pb de *tillandsia 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 ya que son útiles como biomarcadores. Un experimento de este tipo también permitiría confirmar el posible efecto inhibitorio de los gases NO₂ y SO₂ sobre la producción de clorofilas.

BIBLIOGRAFÍA

Bahl, A., Kahl, G. (1995). Air pollutant stress changes the steady-state transcript levels of three photosynthesis genes. *Environmental Pollution* 88, 57-65.

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.

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.

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.

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* (pp. 43-72). Greece: Patras.

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.
- 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.
- 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.
- Malick, C.P. y Singh, M.B. (1980). Plant enzymology and histoenzymology. *Kalyani Publishers New Delhi*. Pp 53.
- 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 Biomonitoring*. Oxford. 3-39.
- 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-Carrillo, M.A., Solís, C., Andrade, E., Isaac-Olivé, Lucho-Constantino, C.A., López, R. M.C., Longoria, M.C. (2010). Atmospheric Pollution in the Tula Industrial Corridor studied using a biomonitor and nuclear analytical techniques. *Revista Mexicana de Física* 57 (1) 75-79.
- Martínez-Reséndiz, G. (2011). Biomonitoring 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.
- 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.
- 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.
- Putter, J (1974) In *Methods of Enzymatic Analysis* 2 (Ed Bergmeyer) Academic Press New York, p 685.
- 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.
- Sadasivam, S. Manickam, A. (1996). *Biochemical Methods*. India, *New Age International*. pp 56.
- SEMARNAT. (2009). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Inventario de emisiones de la Región Tula–TepejI, 2005.
- 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.
- 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>.