



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Líquenes epífitos como biomonitores de la
contaminación del aire en los alrededores de una
industria papelera en Morelia, Michoacán, México.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

presenta:

Biól. Violeta Rangel Osornio

Director de tesis:

Dr. Víctor Manuel Gómez Reyes

Morelia, Michoacán; noviembre 2019.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque sin duda me has guiado y me has dado muchas bendiciones.

A mi familia por todo su apoyo. Especialmente a mi mamá por alentarme a seguir estudiando y seguir mis sueños. Gracias papá por que una parte de ti vive en mí y me ha inspirado a seguir adelante. A mis hermanos y tía Alicia por estar siempre.

A Chava por ser mi compañero en cada paso que doy. Muchas gracias por tus consejos y por tus palabras. Te amo demasiado.

A mis amig@s por su cariño y apoyo. A Fani, Pau y Ale por ser mis mejores amigas y siempre estar para mí en las buenas y malas.

A mis amigas liquenólogas Ana y Sonia por enseñarme más del maravilloso mundo de los líquenes y por todas nuestras aventuras juntas. Mis leonesas favoritas.

A Dulce, Mariela, Arubi y Zulma por ser las mejores ayudantas en campo y laboratorio, y por todos los buenos momentos que hemos pasado. Gracias niñas, las quiero mucho.

A la maestra Marlene Gómez Peralta por siempre apoyarme y guiarme, aunque sea fuera de la vida académica.

Muy especial agradecimiento a mi amigo Arturo Ramírez Ordorica por toda su ayuda en el trabajo experimental, por contestar todas mis preguntas, y por soportarme.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Gómez Reyes por confiar en mi para este proyecto y por impulsarme a continuar con la maestría. Por toda su ayuda y consejos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Ruth Alfaro Cuevas Villanueva por todo su apoyo y por ser parte fundamental para el desarrollo de este proyecto. Gracias por confiar en mi desde el primer momento y por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Ana Belén Fernández Salegui por todas sus enseñanzas y consejos. Gracias por brindarme la oportunidad de aprender de usted y de toda su experiencia. Por ayudarme a e inspirarme a querer seguir aprendiendo de los líquenes.

A los miembros del comité el Dr. Leonel López Toledo, el Dr. Ricardo Pérez Munguía y la Dra. Yazmín Carreón Abud por todos sus comentarios y aportaciones para la realización de esta tesis.

A las personas de los alrededores del área de estudio, las cuales nos brindaron su apoyo para poder colocar el experimento y mantenerlo durante el periodo de estudio.

Al Área Voluntaria para la Conservación “El Tocuz” por permitirnos recolectar material y prestarnos sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Al Dr. Arnulfo García Blanco por su confianza y facilitar la utilización del fluorómetro modulado para las mediciones de clorofila.

A la M. C. Elizabeth Hernández Álvarez, la Dra. Ofelia Morton y a todo el equipo del Laboratorio ICP-MS del Instituto de Geofísica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por todo su apoyo para la preparación de las muestras y el análisis químico. Especialmente a la maestra Elizabeth por su apoyo analítico en la determinación de elementos traza. Gracias también por recibirme durante mi estancia.

Gracias a la Universidad de León (ULE) en España por recibirme durante mis estancias académicas y en especial, a todos los miembros del Departamento de Botánica.

A mi escuela, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental, por permitirnos continuar preparándonos para la vida profesional.

A CONACyT por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN GENERAL.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos particulares.....	13
4. CAPITULO I: Contenido de clorofila y síntomas de daños en trasplantes de líquenes alrededor de una industria papelerera en Morelia (Michoacán, México).....	14
Resumen.....	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
2. Materiales y métodos.....	17
2.1. Área de estudio.....	17
2.2. Diseño de muestreo.....	18
2.3. Recolección de material y trasplante.....	19
2.4. Análisis de clorofila.....	20
2.5. Síntomas de daños.....	20
2.6. Análisis de datos.....	20
3. Resultados.....	22
3.1. Contenido de clorofila total en el talo.....	22
3.2. Distribución espacial del contenido de clorofila.....	26
3.3. Síntomas de daños.....	26
4. Discusión.....	28
5. Conclusiones.....	32
6. Agradecimientos.....	33
7. Referencias.....	33

5. CAPÍTULO II: Bioacumulación de elementos en trasplantes de líquenes epífitos en los alrededores de una industria papelera en Morelia (Michoacán, México).....	38
Resumen.....	38
Abstract.....	39
1. Introducción.....	40
2. Materiales y métodos.....	41
2.1. Área de estudio.....	41
2.2. Diseño de muestreo.....	43
2.3. Recolección de muestras y trasplante.....	43
2.4. Bioacumulación de elementos: Análisis químico.....	44
2.5. Análisis de datos.....	45
3. Resultados.....	47
3.1. Bioacumulación de elementos.....	47
3.2. Distribución de elementos en el área de estudio.....	55
3.3. Relación entre elementos.....	58
4. Discusión.....	61
4.1. Acumulación en el área de estudio y sitios control.....	61
4.2. Variación entre especies.....	65
4.3. Patrones de distribución de los elementos.....	66
4.4. Relación entre elementos y fuentes de origen.....	68
5. Conclusiones.....	70
6. Agradecimientos.....	71
7. Referencias.....	71
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	76
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	79
8. RECOMENDACIONES.....	81

RESUMEN GENERAL

Durante la producción de papel se pueden emitir diferentes sustancias químicas a la atmósfera que afectan la salud humana y el medio ambiente lo cual motiva su evaluación. En este trabajo, los líquenes *Flavopunctelia praesignis* y *Usnea ceratina* fueron utilizados como biomonitores de la contaminación del aire en las inmediaciones de una industria papelerá en Morelia (Michoacán, México). Para ello, muestras de ambas especies fueron recolectadas y trasplantadas a diferentes sitios alrededor de la industria, analizándose el efecto de la contaminación sobre: a) el contenido de clorofila total y la presencia de síntomas de daños y b) la acumulación de elementos. Los resultados fueron comparados con dos sitios control. Después de cuatro meses de exposición, las dos especies de líquenes mostraron una diferente respuesta a la contaminación ambiental. Los trasplantes de *F. praesignis* expuestos en el área industrial presentaron un incremento en su contenido de clorofila, así como menores síntomas de daño. En cambio, *U. ceratina* mostró una menor vitalidad, la cual se vio reflejada en una disminución en su contenido de clorofila y la presencia de síntomas de daño sobre el talo. Trazas de 11 elementos (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V y Zn) fueron encontradas en los trasplantes de ambas especies de líquenes; sin embargo, mayores niveles de acumulación fueron observados en *F. praesignis*. Las diferencias en la vitalidad de las especies y su capacidad para acumular elementos fueron relacionadas con las características morfológicas del talo, así como con su tolerancia a la contaminación. Un efecto importante de variables como la distancia, orientación y dirección de los vientos sobre los patrones de distribución de los diferentes parámetros analizados fue observado. En general, las zonas con menores valores de vitalidad correspondieron con aquellas con mayor contaminación, mientras que, mayores valores de vitalidad se observaron en los sitios con menores niveles de acumulación. Estrechas correlaciones entre los elementos estudiados indican que, además de la industria papelerá, existen otras fuentes de elementos en el área de estudio como son: el suelo, actividades agrícolas, el tráfico vehicular y la zona urbana.

Palabras clave: trasplantes, vitalidad, tolerancia, bioacumulación, elementos.

ABSTRACT

During the production of paper different chemical substances can be emitted into the atmosphere that affect human health and the environment, which motivates their evaluation. In this study, the lichens *Flavopunctelia praesignis* and *Usnea ceratina* were used as biomonitors of air pollution in the vicinity of a paper industry in Morelia (Michoacán, Mexico). For this samples of both species were collected and transplanted to different sites around the industry for analyze the effect of contamination on: a) the total chlorophyll content and the presence of damage symptoms and b) the accumulation of elements. The results were compared with two control sites. After four months of exposure the two species of lichens showed a different response to environmental pollution. The transplants of *F. praesignis* exposed in the industrial area showed an increase in their chlorophyll content, as well as lower symptoms of damage. Moreover, *U. ceratina* showed a lower vitality which was reflected in a decrease in its chlorophyll content and the presence of symptoms of damage on the thallus. Traces of 11 elements (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V and Zn) were found in the transplants of both species of lichens, however, higher levels of accumulation were observed in *F. praesignis*. The differences in the vitality of the species and their ability to accumulate elements were related to the morphological characteristics of the thallus as well as their tolerance to contamination. An important effect of variables such as distance, orientation and direction of winds on the distribution patterns of the different parameters analyzed was observed. In general, the areas with lower vitality values corresponded to those in which the contamination was highest while higher vitality values were observed in sites with lower levels of accumulation. Close correlations between the elements studied indicate that other sources of elements could exists in the study area apart of paper industry such as soil, agricultural activities, vehicular traffic and urban zones.

Keywords: transplants, vitality, tolerance, bioacumulation, elements.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente, la contaminación del aire es un problema que afecta a distintas áreas urbanas, rurales e industriales, esto debido al incremento de las emisiones a la atmósfera de distintos contaminantes los cuales tienen efectos importantes sobre la salud humana y el medio ambiente (Kampa y Castanas, 2008; Gerdol *et al.*, 2014). La industria del papel es considerada una de las más contaminantes del mundo, debido a su enorme consumo de recursos naturales y energía (Thompson *et al.*, 2001). Específicamente, durante la obtención de pulpa de celulosa mediante procesos químicos pueden liberarse diferentes sustancias químicas a la atmósfera como materia particulada, dióxido de carbono, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, COV's, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos (EPA, 2002).

El monitoreo de la calidad del aire, en ocasiones, resulta ser complejo, debido a la presencia de un gran número de sustancias en la atmósfera y, a las variaciones espaciales y temporales que éstas pueden llegar presentar (Gerdol *et al.*, 2014). Así mismo, los métodos convencionales físicos o químicos, implican el uso y mantenimiento de equipos de medición costosos y el desarrollo de protocolos de muestreo demasiado extensos (Conti *et al.*, 2009). El biomonitoreo representa una alternativa rápida y de bajo costo, que no solo nos provee de información sobre los niveles de contaminación, sino también nos permite evaluar sus efectos sobre organismos vivos y, a partir de ellos, hacer inferencias sobre la calidad del ambiente que les rodea (Garty, 2001; Sujetoviene y Sliumpaite, 2013). De esta manera, el biomonitoreo puede ayudar a complementar los métodos químicos y físicos y, a la implementación de políticas ambientales relacionadas con el control de la contaminación del aire (Pirintsos y Loppi, 2008; Kularatne y Freitas, 2013; Paoli *et al.*, 2018).

Los líquenes son organismos formados de la asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y un alga o una cianobacteria (fotobionte), o ambos (Brodo *et al.*, 2001). Estos organismos en conjunto forman una unidad biológica con características morfológicas, fisiológicas y ecológicas muy específicas, conocida como talo (Barreno y Pérez-Ortega, 2003).

Los líquenes pueden encontrarse en una gran diversidad de ecosistemas terrestres de climas fríos y cálidos, incluidos hábitats extremos como desiertos o las regiones polares y alpinas, donde a las plantas vasculares tienen dificultades para desarrollarse (Barreno y Pérez-Ortega, 2003). La resistencia de los líquenes a ambientes extremos está

estrechamente relacionada con su naturaleza poiquilohídrica la cual les permite soportar condiciones adversas cuando se encuentran inactivos a causa de la desecación (Vivas *et al.*, 2013). De esta manera, su distribución es muy amplia y actualmente, es común observarlos en diferentes ambientes antropizados (Hawkworth *et al.*, 2005).

Los líquenes tienen características particulares que los hacen especialmente sensibles a la contaminación del aire, por lo que son ampliamente utilizados como biomonitores (Nimis *et al.*, 2002). Ellos dependen principalmente de la atmósfera para la obtención de nutrientes, y al carecer de cutícula o estomas, son capaces de absorber indiscriminadamente una amplia variedad de contaminantes a través de toda su superficie (Loppi y Pirintsos, 2003). Así mismo, los líquenes se caracterizan por ser organismos longevos de lento crecimiento, pudiendo permanecer expuestos a la contaminación por largos periodos de tiempo e incluso ser muestreados durante todo el año, proporcionando una imagen de estados crónicos y no de variaciones puntuales del medioambiente (Hawksworth *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2009).

No obstante, la sensibilidad de los líquenes está relacionada principalmente con su naturaleza simbiótica, ya que cualquier alteración en el equilibrio que existe entre el fotobionte y micobionte, puede llevar a la muerte de ambos organismos (Gries, 1996).

De acuerdo con Conti y Ceccehetti (2001) los líquenes en estudios de biomonitorio pueden ser usados principalmente de dos formas:

- 1) Mediante el mapeo de la diversidad de especies de líquenes presentes en una determinada área; es decir, el análisis la presencia o ausencia de especies indicadoras y de los cambios en sus patrones distribución y abundancia en sitios con diferentes niveles de contaminación atmosférica.
- 2) A través del trasplante de líquenes nativos de un área no contaminada hacia otra con problemas de contaminación, lo que permite analizar cambios en la morfología de las especies (síntomas), evaluar parámetros fisiológicos o estudiar la bioacumulación y los patrones de deposición de uno o varios contaminantes.

En el presente trabajo se realizó un estudio de biomonitorio en los alrededores de una industria papelera en la ciudad de Morelia. El objetivo fue evaluar el efecto de sus emisiones sobre la vitalidad y la bioacumulación de elementos en trasplantes de los

líquenes epifitos *Flavopunctelia praesignis* (Nyl.) Hale y *Usnea ceratina* Ach. expuestos en el área de estudio.

Referencias

Barreno-Rodríguez, E., Pérez-Ortega, S. 2003. Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura del Principado de Asturias, KKK. España.

Brodo, I. M., Duran-Sharnoff, S., Sharnoff, S. 2001. Lichens of North America. Yale University Press, New Haven, Londres.

Conti, M. E., Cecchetti, G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment: a review. *Environ. Pollut.* 114: 471-492.

Conti, M. E., Pino, A., Botrè, F., Bocca, B., Alimonti, A. 2009. Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). *Ecotox. Environ. Safe.* 72(4): 1082-1089.

EPA. 2002. Profile Of The Pulp And Paper Industry. 2nd ed. Sector Notebook Project.

Garty, J. 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit. Rev. Plant. Sc.* 20: 309-371.

Gerdol, R., Marchesini, R., Iacumin, P., Brancaleoni, L. 2014. Monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors. *Chemosphere*, 108: 388-395.

Gries, C. 1996. Lichens as indicators of air pollution. En: Nash III, T. H. (ed.), Lichen biology, pp. 241-254. Cambridge University Press, Nueva York, EUA.

Hawksworth, D. L., Iturriaga, T., Crespo, A. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medioambientales en los trópicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 71-82.

Kampa, M., Castanas, E. 2008. Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* 151(2): 362-367.

Kularatne, K. I. A., De Freitas, C. R. 2013. Epiphytic lichens as biomonitors of airborne heavy metal pollution. *Environ. Exp. Bot.* 88: 24-32.

Loppi, S., Pirintsos, S. A. 2003. Epiphytic lichens as sentinels for heavy metal pollution at forest ecosystems (central Italy). *Environ. Pollut.* 121: 327-332.

Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A. (eds). 2002. Monitoring with Lichens-Monitoring lichens. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Paoli, L., Vanninia, A., Fačkovcováb, Z., Guarnieria, M., Bačkorc, M., Loppi, S. 2018. One year of transplant: Is it enough for lichens to reflect the new atmospheric conditions?. *Ecol. Indic.* 88: 495-502.
- Pirintsos, S. A., Loppi, S. 2008. Biomonitoring atmospheric pollution: The challenge of times in environmental policy on air quality. *Environ. Pollut.* 151: 269-271.
- Sujetoviene, G., Sliumpaite, I. 2013. Response of *Evernia prunastri* transplanted to an urban area in central Lithuania. *Atmos. Pollut. Res.* 4(3): 222-228.
- Thompson, G. Swain, J., Kay, M., Forster, C. F. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technol.* 77: 275-286.
- Vivas, R. M. 2013. Adaptación y tolerancia de los líquenes a condiciones adversas a través de gradientes ambientales. Memoria tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

2. HIPÓTESIS

- ❖ La sensibilidad de los líquenes a diferentes contaminantes atmosféricos y su capacidad para acumularlos en su talo, nos permitirán determinar la manera en que las emisiones de una industria papelera contribuyen a la contaminación del aire de sus alrededores.

- Las características morfológicas del talo influyen sobre la capacidad de los líquenes para atrapar elementos desde el aire. Por ello se espera que la sensibilidad a la contaminación varíe entre las dos especies de líquenes estudiadas, las cuales muestran diferente tipo de talo.

- La distancia de la fuente de contaminación, así como los vientos dominantes, son variables que influyen sobre los patrones con los que se distribuyen los contaminantes, por lo que se espera observar una mayor concentración de contaminantes y una disminución en la vitalidad conforme la distancia hacia la industria disminuya, y en la dirección de los vientos dominantes en el área de estudio.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Realizar un estudio de biomonitoreo de la contaminación del aire en los alrededores de una industria papelera en Morelia, Michoacán, mediante la utilización de trasplantes de dos especies líquenes epífitos: *Flavopunctelia praesignis* y *Usnea ceratina*.

3.2. Particulares

- Evaluar en qué medida es afectada la vitalidad de los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* en los alrededores de la papelería, mediante el análisis del contenido de clorofila total y la presencia de síntomas de daños sobre el talo (CAPITULO I)
- Evaluar la bioacumulación de trazas de elementos en el talo de ambas especies de líquenes, así como determinar sus patrones de acumulación y distribución en el área de estudio (CAPITULO II)
- Determinar si existen diferencias interespecíficas entre los trasplantes en relación a su sensibilidad y capacidad para acumular elementos.
- Determinar zonas con diferente grado de perturbación, mediante el mapeo de zonas de isocontaminación y de daños fisiológicos en los trasplantes.

4. CAPITULO I

Contenido de clorofila y síntomas de daños en trasplantes de líquenes alrededor de una industria papelera en Morelia (Michoacán, México).

Resumen

Los líquenes *Flavopunctelia praesignis* y *Usnea ceratina* se utilizaron como biomonitores de la contaminación del aire en las inmediaciones de una industria papelera en Morelia (Michoacán, México). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la contaminación del aire en el área sobre la vitalidad de los líquenes, medida a través del contenido de clorofila y la presencia de síntomas de daños en el talo. Para ello, muestras de ambas especies fueron trasplantadas a diferentes sitios de monitoreo alrededor de la industria y expuestas cuatro meses. De igual manera, se colocaron trasplantes en dos sitios control. Tras el periodo de exposición, se registró un incremento significativo en el contenido de clorofila en los trasplantes de *F. praesignis* ubicados alrededor de la papelera. Esta misma respuesta fue observada en los sitios control, lo cual sugiere posibles variaciones estacionales en el contenido de pigmentos fotosintéticos. Los talos de *U. ceratina* trasplantados cerca del área industrial y en la dirección de los vientos dominantes exhibieron claros síntomas de estrés, al presentar mayores daños sobre el talo y menores contenidos de clorofila. La diferente sensibilidad mostrada por ambas especies de líquenes puede ser explicada en función de sus características morfológicas. Los cambios observados sobre la vitalidad de los líquenes parecen estar relacionados con la presencia de contaminantes tóxicos como SO₂ en los alrededores de la industria papelera.

Palabras clave: trasplantes, biomonitoreo, vitalidad, tolerancia, contaminación del aire.

Abstract

The lichens *Flavopunctelia praesignis* and *Usnea ceratina* were used as biomonitors of air pollution in the vicinity of a paper industry in Morelia (Michoacán, Mexico). The aim of this study was evaluate the effect of air pollution in the area on the vitality of lichens, measured through the total chlorophyll content and the presence of damaged symptoms on the thallus. For this, samples of both species were transplanted to different monitoring sites around the industry and exposed for four months. In the same way, transplants were placed in two control sites. After the exposure period, there was a significant increase in the chlorophyll content in the *F. praesignis* transplants located around the paper industry. The same response was observed in the control sites which suggests possible seasonal variations in the content of photosynthetic pigments. The tallus of *U. ceratina* transplanted near the industrial area and in the direction of the prevailing winds exhibited clear symptoms of stress, presenting greater damage on the thallus and lower chlorophyll contents. The different sensitivity shown by both species of lichens could be explain by their morphological traits. Changes observed on the vitality of lichens appear to be related to the presence of toxic contaminants such as SO₂ in the vicinity of the paper industry.

Keywords: transplants, biomonitoring, vitality, tolerance, air pollution.

1. Introducción

La industria del papel es considerada una fuente importante de contaminación ambiental debido a su enorme consumo de recursos y energía (Thompson *et al.*, 2001). Particularmente, el proceso químico para la obtención de pulpa de celulosa al sulfato o Kraft es responsable de la emisión de diferentes contaminantes a la atmósfera, entre ellos, materia particulada, monóxido y dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre y compuestos reducidos de azufre, los cuales pueden tener efectos sobre la salud humana y el medio ambiente (Bordado y Gómes, 1997; EPA, 2002; Cheremisinoff y Rosenfeld, 2010).

Los líquenes han sido ampliamente reconocidos por su sensibilidad a la contaminación atmosférica, siendo comúnmente utilizados como bioindicadores o biomonitores de la calidad del aire (Conti y Cecchetti, 2001; Nimis *et al.*, 2002). La sensibilidad de los líquenes está relacionada principalmente con su naturaleza simbiótica, ya que cualquier alteración en el equilibrio que existe entre el fotobionte y micobionte, puede llevar a la muerte del organismo (Hawksworth *et al.*, 2005). De los dos simbioses, el fotobionte es reconocido por ser el más sensible a los contaminantes atmosféricos, como el SO₂ (Hawksworth y Rose, 1976; Richardson y Nieboer, 1981; Gries, 1996).

La exposición a un ambiente contaminado puede llevar a daños fisiológicos sobre especies de líquenes sensibles, como resultado de la intensidad de contaminación (Vannini *et al.*, 2017). Una de las principales funciones afectadas por la contaminación del aire es la actividad fotosintética del líquen, provocando su disminución (Garty, 2001), lo cual a su vez está relacionado con la degradación de las moléculas de clorofila y una reducción de su contenido en las células del fotobionte (Ronen y Galun, 1984; Sanz *et al.*, 1992; Calatayud *et al.*, 1996; González *et al.*, 1996; Garty *et al.*, 2001; Bajpai *et al.*, 2010). Asimismo, pueden producirse daños en la morfología del talo que pueden afectar la vitalidad de ambos simbioses (Leblanc y Rao, 1973; Hawksworth y Rose, 1976; Fernández-Salegui *et al.*, 2002; Estrabou *et al.*, 2004). No obstante, la respuesta de los líquenes a la contaminación puede variar de una especie a otra (Gries, 1996).

El uso de líquenes como biomonitores de la contaminación del aire proveniente de las fábricas de celulosa y papel ha sido también estudiado, observándose un efecto negativo de sus emisiones sobre la actividad fotosintética de estos organismos (Sheridan *et al.*, 1976; Holopainen, 1983; Azevedo *et al.*, 2012).

En la ciudad de Morelia, se encuentra ubicada una industria papelera Kraft la cual, de acuerdo con reportes en 2013, constituía una de las principales fuentes de emisiones de dióxido de azufre y materia particulada (SUMA, 2015). Sin embargo, hoy en día, no se cuenta con un monitoreo continuo de la calidad del aire en los alrededores de dicha industria.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de las emisiones de la industria papelera sobre la vitalidad de trasplantes de los líquenes epífitos *Flavopunctelia praesignis* (Nyl.) Hale y *Usnea ceratina* Ach. Para ello, se evaluaron el contenido de clorofila total y los síntomas de daños sobre el talo de ambas especies de líquenes tras cuatro meses de exposición.

2. Materiales y Métodos

2.1. Área de estudio

El área de estudio se ubica al suroeste de la ciudad de Morelia, Michoacán, entre las coordenadas 19.65°N y 19.64°S de latitud, y 101.27°W y 101.26°E de longitud, a una altitud de 1896 m (Figura 1). El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (Figura 2 A-C). La temperatura media anual es de 17.8 °C, con mínima de 13.7°C en invierno y máxima de 20.8 °C en verano; la precipitación anual oscila entre 600-800 mm y se distribuye entre mayo y septiembre (SMN, 2011). Los vientos dominantes soplan desde el sureste (OOAPAS, 2019).

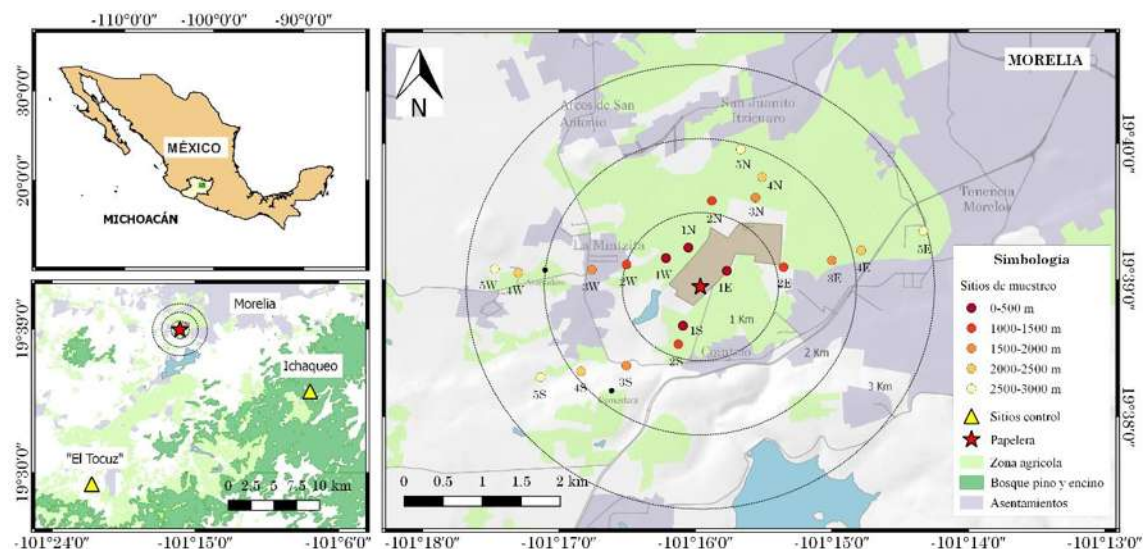


Figura 1. Ubicación del área de estudio y sitios de monitoreo. Se muestra detalle del relieve (INEGI, 2013).

Dicha área comprende las instalaciones de dos plantas de pulpa de celulosa y papel Kraft. De acuerdo con reportes previos de estaciones automáticas de monitoreo, en 2013 esta industria era responsable del 43.8% de las emisiones atmosféricas de SO₂ (2,954.1 Gg/año), así como del 18% (431.2 Gg/año) y 23% (370.1 Gg/año) de las correspondientes a PM₁₀ y PM_{2.5}, respectivamente (SUMA, 2015).

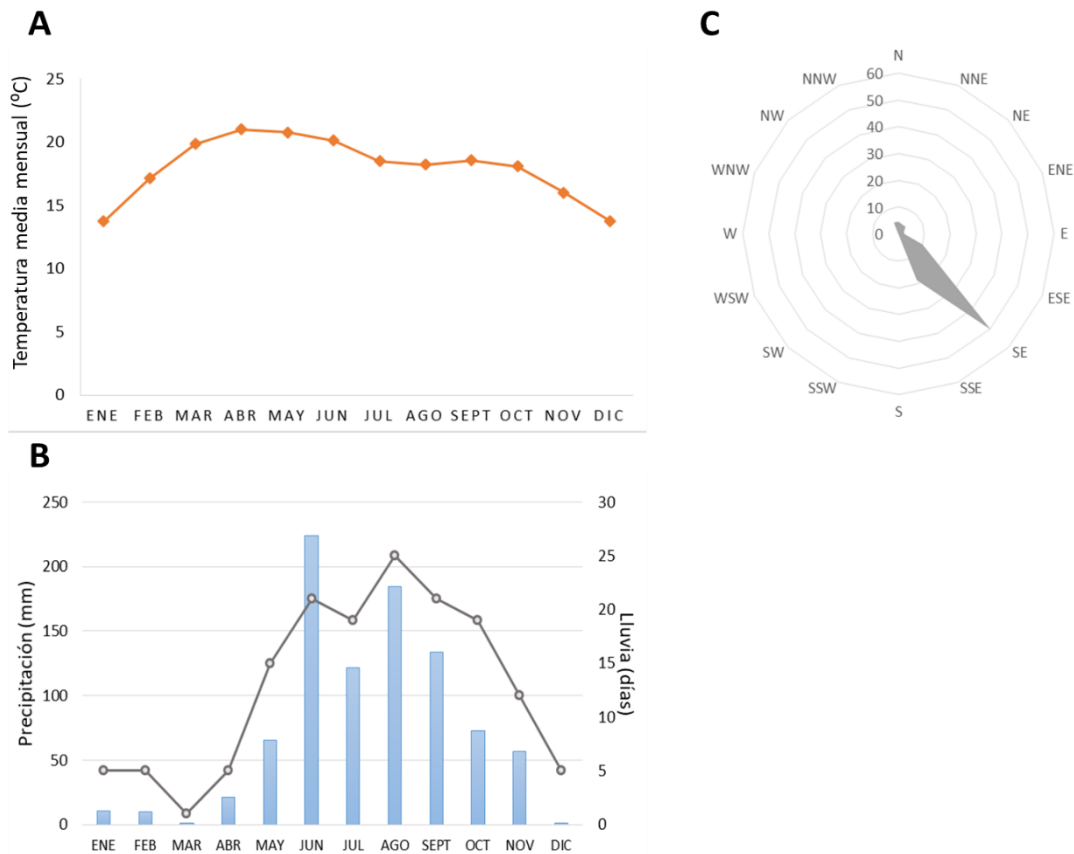


Figura 2. Datos climáticos provenientes de la estación meteorológica cercana al área de estudio (Mintzita). A) Temperatura media mensual °C, B) Precipitación mensual (mm) y no. de días de lluvia, C) Dirección y porcentaje de vientos dominantes (SMN, 2011; OOAPAS, 2019).

2.2. Diseño de muestreo

En el área de estudio se seleccionaron 20 sitios de monitoreo alrededor de la papelera. En un principio, se pretendió separar estos sitios por una determinada distancia y ubicarlos en las cuatro direcciones cardinales (N, S, E y W); sin embargo, debido a las condiciones de uso de suelo (agrícolas o de pastoreo) y la topografía del área de estudio se presentaron variaciones. Los sitios de monitoreo fueron ubicados lo más uniformemente posible, de

tal manera que la distancia a la fuente de contaminación incrementara (Figura 1). En cada sitio se seleccionaron tres árboles de las especies *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. y *Salix babylonica* L. que sirvieron de sustrato para los trasplantes.

2.3. Recolección de material y trasplante

El líquen folioso *Flavopunctelia praesignis* y el líquen fruticoso *Usnea ceratina* son especies comunes en zonas montañosas de bosques templados de coníferas (*Pinus* sp.) y de encino (*Quercus* sp.) en México (Nash *et al.*, 2002; Herrera-Campos *et al.*, 2016). Ambas especies fueron seleccionadas por su fácil recolección, identificación y por distribuirse en bosques de pino-encino de los alrededores de Morelia y municipios cercanos (Gregorio-Cipriano *et al.*, 2016). Otros estudios en áreas contaminadas de México han empleado especies del género *Usnea* y *Flavopunctelia* como biomonitores (Gómez-Peralta y Chávez-Carmona, 1995; Zambrano y Nash, 2000; Cervantes *et al.*, 2008).

Los talos de ambas especies de líquenes fueron recolectados principalmente de dos localidades control en marzo del 2018. Las muestras de *F. praesignis* se recolectaron en el Área Voluntaria para la Conservación (AVC) “El Tocuz” (19.48°N, 101.35°W), mientras que las de *U. ceratina* en la localidad de Ichaqueo (19.58°N, 101.13°W), ubicadas a 32 y 16.5 km del área de estudio, respectivamente (Figura 1). Ambas localidades presentan un clima templado, con temperaturas medias anuales de 15°C y precipitaciones >1000 mm anuales, y son dominadas por bosques de pino y encino (SMN, 2011; INEGI, 2017).

Las recolectas se hicieron principalmente en árboles de encino, y para evitar la variación dada por las diferencias de sustrato en el área de estudio, los líquenes fueron recolectados con parte de la corteza o de la rama que los sostuviera (Mikhailova, 2002). En el área de estudio, sobre cada árbol se colocaron cinco trasplantes de cada especie, en total 15 por sitio. Los trasplantes fueron colocados dentro de pequeñas redes de fibra de plástico (20 x 20 cm) a manera de sobres, a una altura de 2 m del suelo y orientados en dirección a la papelera.

Como control, también se colocaron trasplantes (n=15) en los sitios donde fueron recolectados los líquenes, siendo *F. praesignis* retrasplantada en el AVC “El Tocuz”, mientras que *U. ceratina* en la localidad de Ichaqueo. La información obtenida en dichos sitios fue utilizada como referencia para determinar posibles cambios en el contenido de

clorofila total y la morfología del talo. Los líquenes fueron expuestos durante un período de 127 días, en concreto de abril a agosto de 2018.

2.4. Análisis de clorofila

La vitalidad de los trasplantes se evaluó mediante un análisis del contenido de clorofila total del talo. El análisis del contenido de clorofila nos permite estudiar el efecto de la contaminación del aire sobre la integridad del fotobionte (Garty *et al.*, 2001).

El contenido de clorofila en el talo fue medido con la ayuda de un fluorómetro modulado CCM-300 (Opti-Sciences, Inc.). La medición modulada de la fluorescencia de la clorofila es considerada una técnica no intrusiva que permite analizar parámetros fotosintéticos en líquenes (Garty *et al.*, 2001). Para la medición, el sensor se colocó sobre los lóbulos de la periferia en el caso de *F. praesignis*, y sobre las ramillas del talo en *U. ceratina*. Las mediciones se realizaron para cada sitio de trasplante por triplicado, antes y después del periodo de exposición, Los resultados correspondieron al contenido de clorofila total y fueron expresados en unidades de masa por área mg m^{-2} (Gitelson *et al.*, 1999).

2.5. Síntomas de daños

Para determinar la presencia síntomas en los líquenes, se realizaron fotografías de los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina*, antes y después del periodo de exposición. Posteriormente, los síntomas observados (cambios de coloración, blanqueamiento, necrosis, etc.) fueron analizados y descritos tomando en cuenta su localización, frecuencia y el porcentaje de cobertura en el talo (Fernández-Salegui *et al.*, 2002). A partir de dicha información se elaboró una escala de síntomas de daños para las dos especies en el área de estudio, la cual constó de tres categorías: I) Talo sin daños II) Talo moderadamente dañado y III) Talo muy dañado.

2.6. Análisis de datos

La distribución normal de los datos se analizó con una prueba de Shapiro-Wilk. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados a normales utilizando la función de logaritmo.

El contenido de clorofila en talo fue comparado entre: a) sitios de trasplante (área de estudio y sitios control), b) especies de líquenes (*F. praesignis* y *U. ceratina*) y c) antes y después del periodo de exposición. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos

fueron evaluadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, o bien, con Modelos Lineales Generalizados (MLG), en el caso de las variables que no presentaran una distribución normal.

El efecto de la orientación y la distancia de los sitios de monitoreo sobre el contenido de clorofila total se evaluó mediante un Análisis de Covarianza (ANCOVA), en el que también se analizó la interacción entre los factores. De haber diferencias significativas ($p < 0.05$) se realizaron pruebas posteriori paramétricas (Tukey test) o no paramétricas (Duncan Test), según fuera el caso. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa estadístico R (R Core Team, 2018).

Para determinar cuantitativamente los cambios en el contenido de clorofila, se calculó un porcentaje de variación (P.V.).

Con la finalidad de identificar zonas con diferente grado de alteración fisiológica en el área de estudio, la distribución del contenido de clorofila total fue representada mediante la elaboración de mapas, utilizando el programa SURFER (Golden Software Inc.) y cómo método de interpolación se seleccionó *kriging* (Paoli *et al.*, 2011).

3. Resultados

3.1. Contenido de clorofila total en talo

Los valores de contenido de clorofila total en *F. praesignis* y *U. ceratina*, antes y después del periodo de exposición se muestran en el Tabla 1. Previo al trasplante, el contenido de clorofila total en *F. praesignis* osciló entre 614 y 771 mg m⁻²; mientras que, en el sitio control fue de 679.1 ± 14.2 mg m⁻². Los trasplantes de *U. ceratina* presentaron valores de clorofila entre 625 y 746 mg m⁻² y en el sitio control de 698.2 ± 34.3 mg m⁻².

Tabla 1. Contenido de clorofila total (mg m⁻²) en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina*, alrededor de la industria papelera y en los sitios control, antes y después del periodo de exposición. Los valores de porcentaje de variación (P.V.) también son mostrados. Para cada columna, las diferencias significativas (Tukey o Duncan test, $p < 0.05$) son indicadas con una letra minúscula diferente. P.V. = porcentaje de variación.

Sitio	<i>Flavopunctelia praesignis</i>			<i>Usnea ceratina</i>		
	Antes	Después	P.V.	Antes	Después	P.V.
1N	674.0 ± 35.0	753.1 ± 81.1 ^{ab}	11.7	692.6 ± 38.3	679.8 ± 46.2 ^{ab}	-1.8
2N	664.3 ± 17.7	782.8 ± 96.9 ^{ab}	17.8	656.0 ± 21.8	734.1 ± 51.4 ^{ab}	11.9
3N	682.6 ± 1.2	635.7 ± 64.5 ^b	-6.9	662.3 ± 37.9	659.1 ± 71.2 ^{ab}	-0.5
4N	666.0 ± 23.4	830.6 ± 64.6 ^{ab}	24.0	684.8 ± 50.7	751.0 ± 63.4 ^{ab}	9.7
5N	673.4 ± 31.4	706.4 ± 45.7 ^{ab}	4.0	664.8 ± 47.3	644.5 ± 29.4 ^{ab}	-3.0
1S	655.5 ± 27.5	777.5 ± 106.9 ^{ab}	18.0	674.8 ± 35.9	622.0 ± 52.5 ^b	-7.5
2S	666.8 ± 35.1	898.2 ± 40.5 ^a	34.0	663.5 ± 21.4	761.2 ± 33.5 ^{ab}	14.0
3S	654.8 ± 18.2	751.2 ± 85.6 ^{ab}	14.0	667.0 ± 20.8	728.2 ± 73.5 ^{ab}	9.1
4S	664.8 ± 40.6	827.0 ± 59.2 ^{ab}	24.0	674.8 ± 17.0	702.6 ± 30.0 ^{ab}	4.1
5S	633.0 ± 10.3	800.7 ± 109.6 ^a	26.0	693.5 ± 40.2	726.8 ± 58.0 ^{ab}	4.8
1E	695.0 ± 22.6	714.0 ± 127.4 ^{ab}	2.7	669.8 ± 43.1	691.4 ± 44.0 ^{ab}	3.2
2E	665.5 ± 32.7	723.7 ± 50 ^{ab}	8.7	653.0 ± 22.0	646.3 ± 47.5 ^{ab}	-1.0
3E	692.4 ± 47.5	751.0 ± 82.1 ^{ab}	8.5	660.8 ± 30.7	697.6 ± 68.1 ^{ab}	5.6
4E	671.8 ± 10.9	699.3 ± 69.2 ^b	4.1	686.6 ± 53.0	710.0 ± 54.6 ^{ab}	3.4
5E	669.6 ± 27.6	744.6 ± 46.3 ^{ab}	6.7	658.5 ± 36.5	706.2 ± 49.6 ^{ab}	7.3
1W	662.0 ± 31.2	790.2 ± 123.6 ^{ab}	19.0	665.6 ± 22.7	690.0 ± 106.1 ^{ab}	3.7
2W	673.6 ± 24.7	823.0 ± 162.6 ^{ab}	22.0	656.1 ± 24.3	709.8 ± 85.1 ^{ab}	8.1
3W	691.0 ± 32.1	740.8 ± 113.2 ^{ab}	7.2	680.3 ± 44.1	623.0 ± 22.5 ^b	-8.4
4W	667.2 ± 11.3	838.4 ± 92.4 ^{ab}	25.0	695.0 ± 32.4	632.8 ± 70.8 ^{ab}	-8.9
5W	673.1 ± 43.5	662.3 ± 67.8 ^b	-1.6	667.2 ± 22.9	667.0 ± 51.4 ^{ab}	-0.02
mín.	614.0	562.0		625.0	543.0	
máx.	771.0	999.0		746.0	873.0	
\bar{X}	669.7 ± 29.2	764.4 ± 100.1		671.1 ± 33.3	687.7 ± 67.6	
Control	679.1 ± 14.2	819.0 ± 76.6 ^{ab}	20.5	698.2 ± 34.3	771.0 ± 5.3 ^a	10.0

Media ± desviación estándar. N=Norte, S=Sur, E=Este, W=Oeste, 1-5=no. de sitio.

Después de cuatro meses de exposición, los trasplantes de *F. praesignis* presentaron valores de clorofila entre 562 a 999 mg m⁻². En el sitio control, el contenido de clorofila fue de 819 ± 76.6 mg m⁻². En el caso de *U. ceratina*, el contenido de clorofila osciló entre 543 y 873 mg/m², mientras que en el control registró un valor de 771 ± 5.4 mg/m².

En *F. praesignis*, el contenido de clorofila total varió de manera significativa ($F_{20, 85}=2.65$, $p<0.01$) entre los sitios de monitoreo alrededor de la papelería, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) con respecto al control (Tabla 1). Por su parte en *U. ceratina*, los valores de contenido de clorofila total de algunos sitios de monitoreo variaron significativamente ($p<0.05$) del control (Tabla 1).

En ambas especies de líquenes el contenido de clorofila total varió significativamente (*F. praesignis*: $\chi^2_{1,210}=98.80$, $p<0.0000$; *U. ceratina*: $\chi^2_{1,200}=6.22$, $p=0.01$) entre las muestras antes y después del periodo de exposición. Los trasplantes de *F. praesignis* mostraron un incremento en su contenido de clorofila después de cuatro meses de exposición alrededor de la industria papelería. Esta tendencia también fue observada en el sitio control (Figura 3A). Asimismo, la mayoría de los sitios de monitoreo presentaron valores de porcentaje de variación positivos (Tabla 1).

Los trasplantes de *U. ceratina* expuestos en el área industrial, no mostraron variaciones significativas en su contenido de clorofila después de cuatro meses de exposición. Mientras que, en el sitio control el cambio si fue significativo (Figura 3B). Ocho de los sitios de monitoreo en los que estuvo expuesta *U. ceratina* presentaron porcentajes de variación negativos.

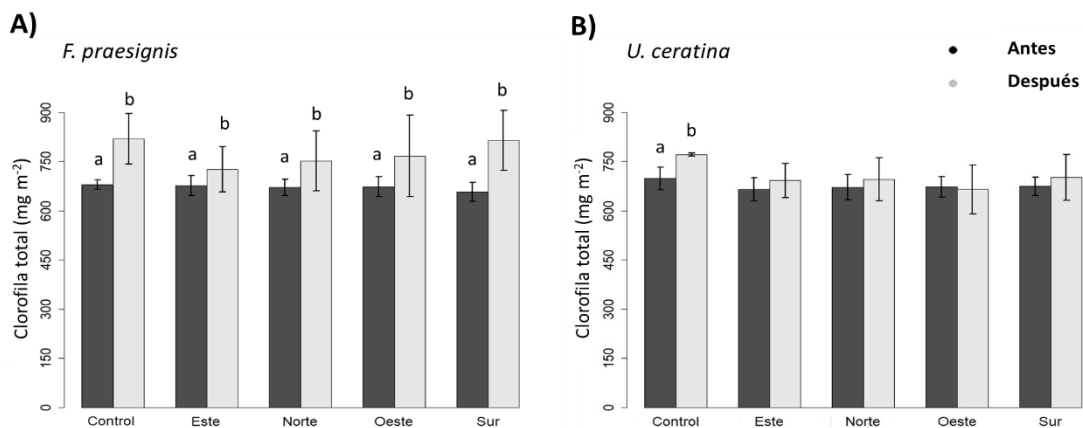


Figura 3. Variación del contenido de clorofila total (mg m⁻²) en: A) *F. praesignis* y B) *U. ceratina* entre antes y después del periodo de exposición. Se muestran los valores de las diferentes orientaciones donde se expusieron los trasplantes alrededor de la papelería, incluyendo a los sitios

control. Las barras con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras antes del trasplante y después de cuatro meses de exposición.

El contenido de clorofila total vario significativamente ($F_{1,181}=41.02$, $p < 0.0000$) entre ambas especies de líquenes después del periodo de exposición, observándose mayores niveles de clorofila en los trasplantes *F. praesignis* expuestos alrededor de la papelera (Figura 4).

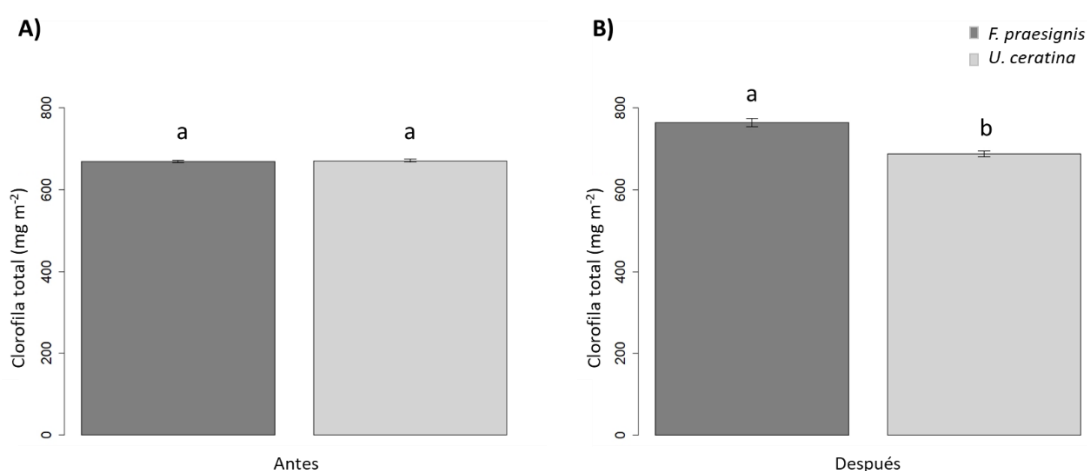


Figura 4. Comparación del contenido de clorofila total (mg m^{-2}) entre *F. praesignis* y *U. ceratina* A) antes y B) después del período de exposición alrededor de la fuente de emisión (industria papelera). Las barras con letras minúsculas diferentes indican variaciones significativas ($p < 0.05$) entre las especies.

El efecto de la orientación y la distancia de los sitios de monitoreo sobre el contenido de clorofila de ambas especies de líquenes se muestra en el Tabla 2. En *F. praesignis*, el contenido de clorofila únicamente vario entre orientaciones, observándose diferencias entre los trasplantes expuestos al este y sur (Figura 5 A y B). Ni la orientación ni la distancia tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de clorofila en los trasplantes de *U. ceratina* (Figura 5 C y D). Asimismo, se muestra una comparación entre los trasplantes expuestos en el área de estudio y los sitios control (Figura 5 A y C). Se observa que los trasplantes de *U. ceratina* expuestos al oeste presentaron menores contenidos de clorofila que el control (Figura 5C).

Tabla 2. Resultados del análisis de covarianza (ANCOVA) para probar el efecto de la distancia y la orientación de los sitios de monitoreo sobre el contenido de clorofila total (mg m^{-2}) en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* después de cuatro meses de exposición. Los valores en negrita y con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$). g.l.=grados de libertad.

Factores	<i>F. praesignis</i>			<i>U. ceratina</i>		
	F	g.l.	p	F	g.l.	p
Distancia (Dist)	2.46	1,92	0.11	0.008	1,89	0.92
Orientación (Orient)	3.15	3,92	0.02*	1.61	1,89	0.19
Dist: Orient	0.65	3,92	0.28	1.62	1,89	0.18

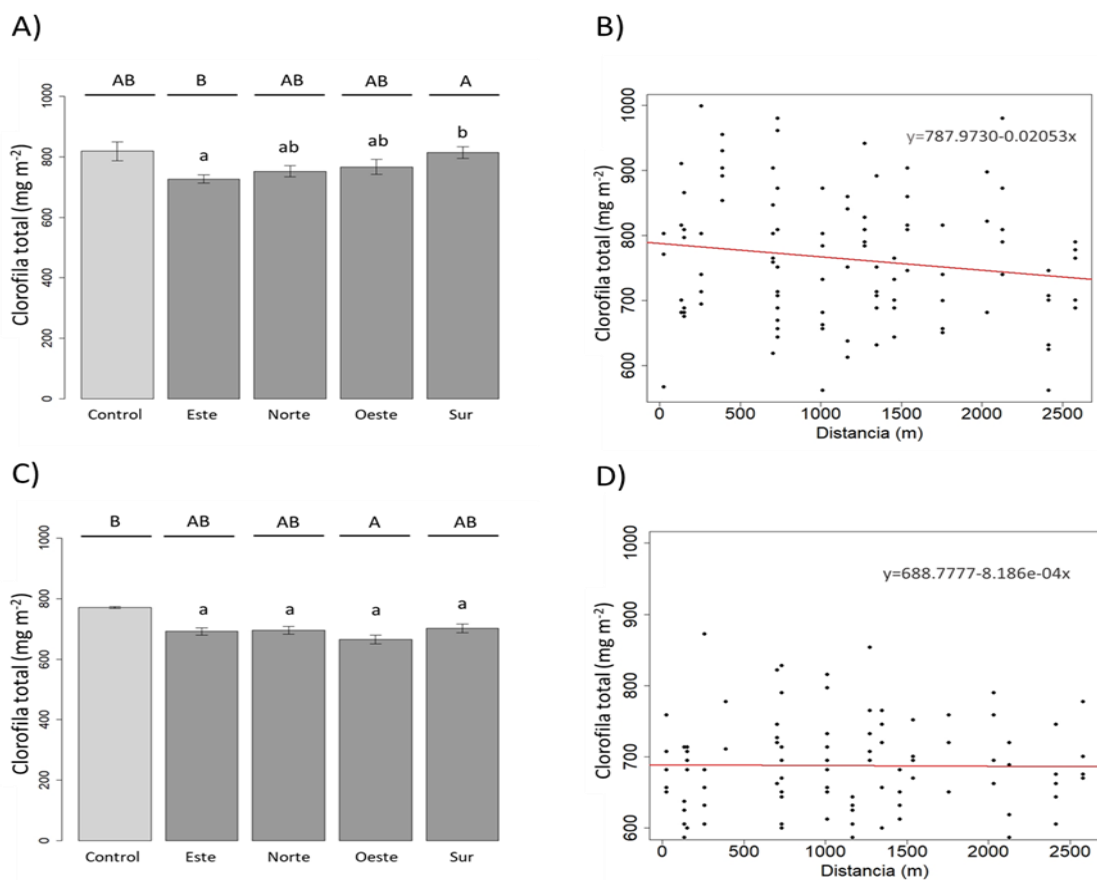


Figura 5. Contenido de clorofila (mg m^{-2}) en trasplantes de *F. praesignis* (A y B) y *U. ceratina* (C y D) después de cuatro meses de exposición, considerando la orientación de los sitios de monitoreo (izquierda) y su distancia respecto a la industria papelera (derecha). En el gráfico de la izquierda se representan los resultados de dos análisis estadísticos: las barras con letras en minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los trasplantes expuestos en las diferentes orientaciones, mientras que letras mayúsculas indican diferencias incluyendo el sitio control.

3.2. Distribución espacial del contenido de clorofila

Los patrones de distribución del contenido de clorofila total en ambas especies de líquenes en el área de estudio se muestran en la Figura 6 A-D. Después de cuatro meses de exposición, los trasplantes de *F. praesignis* tendieron a mostrar bajos niveles de clorofila hacia el noreste y este del área de estudio, y cerca de la papelerera (Figura 6 A y B). Mayores concentraciones de pigmento se registraron en los sitios de monitoreo ubicados al sur y al oeste (Figura 6B). *U. ceratina* presentó menores contenidos de clorofila total en los trasplantes expuestos en sitios más próximos a la papelerera, y en la dirección oeste (Figura 6 C y D). Al igual que *F. praesignis*, los valores más altos de clorofila se registraron hacia el sur del área industrial (Figura 6D).

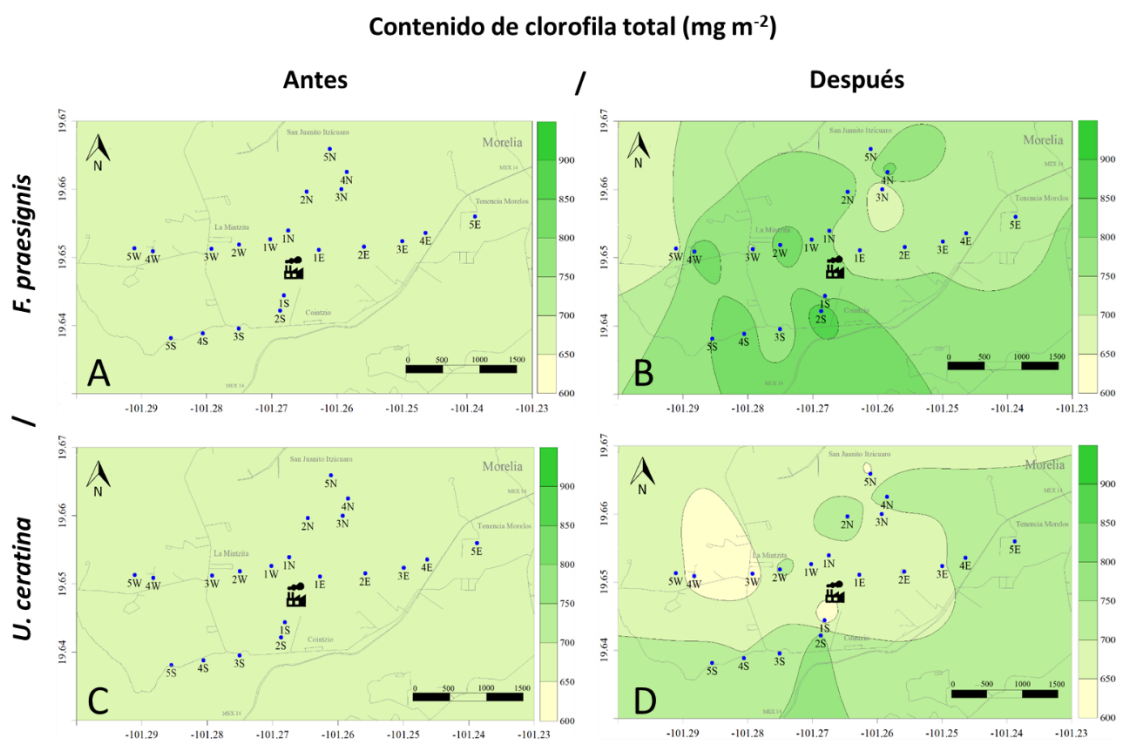


Figura 6. Distribución espacial del contenido de clorofila total (mg m⁻²) en *F. praesignis* (A y B) y *U. ceratina* (C y D) trasplantados en el área de estudio. Se representa la concentración de clorofila antes (izquierda) y después (derecha) del periodo de exposición. La escala indica los valores de clorofila en mg m⁻².

3.3. Síntomas de daños

Los síntomas variaron en su frecuencia y cobertura entre las dos especies de líquenes estudiadas (Figura 7 A-F). Los trasplantes de ambas especies expuestos en los sitios

control no mostraron síntomas de daños después de cuatro meses de exposición (Figura 7 A y D).

Considerando la escala de síntomas propuesta para el área de estudio, los trasplantes de *F. praesignis* se caracterizaron por no mostrar daños sobre el talo (I), o bien, por mostrar talos moderadamente dañados (II). Los síntomas más frecuentemente observados en *F. praesignis* fueron: la aparición de pequeñas manchas marrones-rojizas en diferentes partes del talo, así como la pérdida de córtex y capa algal (Figura 7 A-C). Los trasplantes de *F. praesignis* sin síntomas se registraron en sitios de monitoreo más alejados (>1500 m) de la papelera. Los síntomas de daños tendieron a aparecer conforme la distancia al área industrial disminuía.

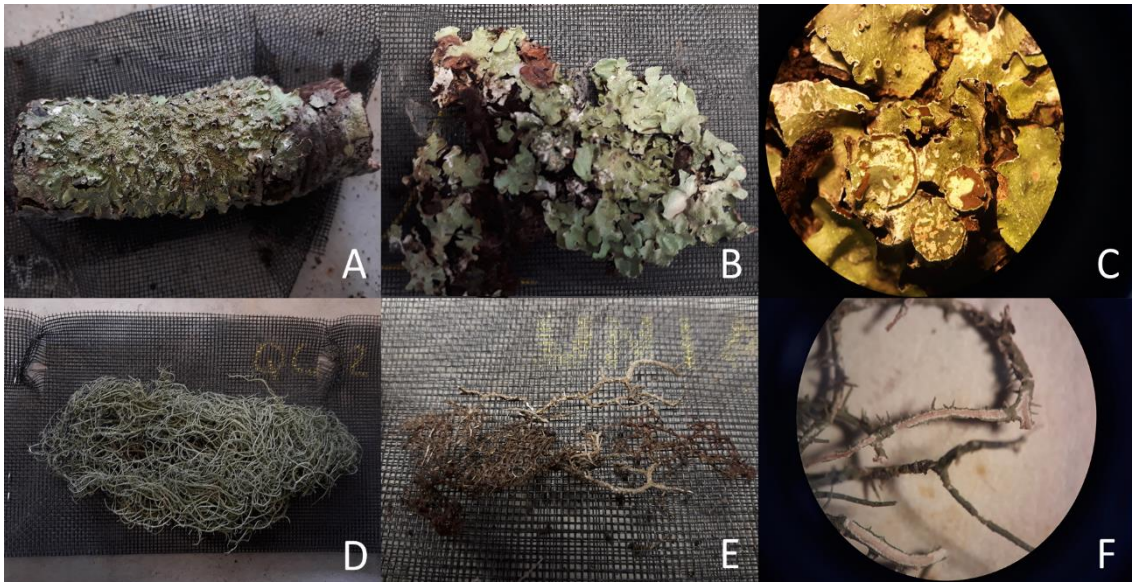


Figura 7. A) y D) Talo sin síntomas (control). B) Manchas marrones rojizas sobre el talo de *F. praesignis*. E) Talo de *U. ceratina* completamente necrosado y degradado. C) y F) Pérdida de capas del talo (córtex superior y capa algal) en ambas especies.

En el área de estudio, los trasplantes *U. ceratina* presentaron talos moderadamente dañados (II) a muy dañados (III). Los trasplantes con daños moderados presentaron pequeñas manchas marrón-rojizas muy localizadas en diferentes partes del talo; mientras que en los talos muy dañados se observaron manchas más extendidas, decoloración del talo, retorcimiento de ramillas, pérdida de córtex y capa algal, necrosis y desprendimiento de partes del talo (Figura 7 D-F). Para *U. ceratina*, la zona con más síntomas de daños se registró hacia el centro del área de estudio, en los sitios de monitoreo más próximos a la

industria papelera. Los síntomas fueron disminuyendo su frecuencia y cobertura conforme la distancia a la fuente de contaminación incrementaba.

4. Discusión

La determinación de la integridad del contenido de clorofila en las células del fotobionte, es una manera eficaz de poder monitorear los efectos de la contaminación del aire sobre los líquenes (Garty, 2001). En el presente estudio, se observó un incremento en el contenido de clorofila en los trasplantes de *F. praesignis* ubicados en los alrededores de la papelera, lo que indicaría a primera vista que la calidad del aire en el área de estudio no afecta la clorofila del fotobionte de esta especie.

De manera similar el contenido de clorofila incrementó en los líquenes trasplantados en los sitios control. Tanto el Área Voluntaria para la Conservación “El Tocuz” como la localidad de Ichaqueo, son consideradas sitios con buena calidad de aire debido a que corresponden a zonas de bosque poco manejadas y alejadas de diferentes fuentes de contaminación urbana e industrial.

La concentración de pigmentos fotosintéticos puede variar por efecto de otros factores diferentes a la contaminación ambiental como: el tipo de micobionte y fotobionte, la especie, el hábitat, las condiciones ambientales y la estación (Boonpragob y Nash, 1991; Chettri *et al.*, 1998; Paoli *et al.*, 2010). Boonpragob y Nash (1991) determinaron que cambios estacionales en el contenido de clorofila son comunes y que su concentración tiende a incrementar después de la precipitación, en comparación con las estaciones de clima más seco y cálido. En nuestro caso, los líquenes fueron trasplantados antes del comienzo de la época de lluvias, en el mes de abril, por lo que el incremento en el contenido de clorofila pudiera relacionarse con una variación estacional (Ver Figura 2B).

Un incremento en la síntesis de clorofila, paralelo a su degradación, ha sido demostrado como una respuesta en líquenes al estrés causado por la contaminación (Carreras *et al.*, 1998; 2005). Carreras *et al.* (1998) observaron que el contenido de clorofila total ($a + b$) en los líquenes incrementaba junto con los niveles de contaminantes emitidos por el tráfico vehicular, lo cual a su vez se relacionó con un incremento en la degradación de la clorofila a . Estos resultados demuestran que, como un mecanismo para compensar el efecto nocivo de los contaminantes, el líquen aumenta la síntesis de pigmentos

fotosintéticos. En nuestro caso, esta respuesta se observa en *F. praesignis*, la cual mostró incrementos y disminuciones en el contenido de clorofila después de su exposición en el área de estudio.

Por otra parte, varios estudios señalan que cambios en la capacidad de intercambio de CO₂, la tasa neta de fotosíntesis y la fluorescencia de la clorofila pueden ser detectados más tempranamente que los que ocurren en cuanto al contenido de pigmentos fotosintéticos (Hawksworth y Rose, 1976; Sanz *et al.*, 1992; Gries *et al.*, 1995; Catalayud *et al.*, 1996; Zambrano y Nash, 2000). Así también se ha mostrado que la feofitinización (la degradación de clorofila a feofitina) y cambios en la proporción de clorofila *a* y clorofila *b* son parámetros más sensibles a la contaminación (Ronen y Galun, 1984; González *et al.*, 1996; Chettri *et al.*, 1998; Garty *et al.*, 2001; Carreras *et al.*, 2005; Sujetoviene y Sliumpaite, 2013).

El tiempo de exposición también puede tener efectos sobre la respuesta de los líquenes a la contaminación del aire (Paoli *et al.*, 2011). En nuestro caso, el periodo de exposición (cuatro meses) pudo no ser suficiente para ver un efecto significativo sobre el contenido de clorofila de *F. praesignis*. Por lo que no se descarta la idea de que esta especie pueda ser utilizada como biomonitor por un período de tiempo más prolongado en el área de estudio.

En el caso de *U. ceratina*, si bien mostró un ligero incremento en su contenido de clorofila, en la mayoría de los sitios alrededor de la papelera se determinaron valores bajos de clorofila después del periodo de exposición en comparación con *F. praesignis*. Lo anterior concuerda con estudios previos en los que se ha reportado reducciones en el contenido de clorofila en líquenes expuestos a contaminantes bajo condiciones de campo (Levin y Pignata, 1995; González *et al.*, 1996; Carreras *et al.*, 1998; Catalayud *et al.*, 1996; Garty *et al.*, 2001; Bajpai *et al.*, 2010).

Variaciones en el contenido de clorofila han sido correlacionadas inversamente con la acumulación de metales en el talo como: Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn (Chettri *et al.*, 1998; Garty *et al.*, 2001; Bajpai *et al.*, 2010). La mayoría de estos metales puede llevar a la desintegración de las moléculas de clorofila o interferir en su síntesis (Garty, 2001). En nuestro caso, la disminución en el contenido de clorofila en los líquenes podría estar relacionada con la contaminación por metales proveniente de diferentes fuentes como la quema de combustibles fósiles, la industria, el tráfico vehicular, el uso de fertilizantes y

plaguicidas, etc. De acuerdo con lo observado en el área de estudio, las zonas que más afectadas por este tipo de contaminación corresponderían a las ubicadas en las direcciones este, norte y oeste, al encontrarse más influenciadas por la actividad industrial y agrícola, el tráfico vehicular y la zona urbana de Morelia.

Después del trasplante al área de estudio, fue posible observar síntomas de daño en los talos de ambas especies de líquenes; sin embargo, estos fueron más evidentes en *U. ceratina*. Las modificaciones morfológicas del talo observadas en este trabajo han sido reportadas como respuesta de los líquenes a la presencia y toxicidad de contaminantes atmosféricos como el SO₂ (LeBlanc y Rao, 1973; Hawksworth y Rose, 1976; Gómez-Peralta y Chávez-Carmona, 1995; Gries, 1996; Fernández-Salegui *et al.*, 2002; Gómez-Peralta y Gómez-Reyes, 2007), o fluoruros (Richardson, 1992).

El SO₂ es considerado el agente más dañino para los líquenes, cuya toxicidad está relacionada principalmente con su naturaleza ácida (Batič, 2002). Este gas al ser muy soluble puede ingresar fácilmente al interior de las células del líquen al disolverse con el agua de lluvia o con la humedad atmosférica (Richardson, 1992). Una vez dentro, el SO₂ disuelto puede disociarse e incrementar la concentración de H⁺ al interior de las células del fotobionte, ocasionando la degradación de la clorofila a un pigmento marrón llamado feofitina, por la pérdida de iones de Mg⁺² (Rao y LeBlanc, 1966).

La pérdida de clorofila es uno de los más claros síntomas de daño en los líquenes causados por la contaminación y puede ser determinada visualmente a través del blanqueamiento del talo o por la aparición de manchas de tonos marrones y rojizos (Rao y Leblanc, 1966; Henriksson y Pearson, 1981; Gries, 1996; Fernández-Salegui *et al.*, 2002).

El efecto de SO₂ sobre los géneros *Usnea* y *Flavopunctelia*, ha sido comprobado en experimentos de fumigación en laboratorio. Gries *et al.* (1995), determinaron una reducción en el intercambio de CO₂ en las especies *U. hirta* (L.) Weber ex F. H. Wigg. y *F. praesignis* (Nyl.) Hale después de un periodo corto de exposición a 1 y 2 ppm de SO₂, concluyendo que ambas eran igualmente sensibles. Además, la sensibilidad del género *Usnea* a óxidos de azufre y nitrógeno se ha determinado en otros trabajos, en los que se ha reportado un incremento en la degradación de pigmentos fotosintéticos (Carreras *et al.*, 1998).

En este estudio, la principal fuente de SO₂ en el área provendría de la industria papelera. El dióxido de azufre y otros compuestos reducidos de azufre (sulfuro de hidrógeno,

metilmercaptano, sulfuro de dimetilo y disulfuro de dimetilo) son contaminantes son comúnmente emitidos durante el proceso químico al sulfato o Kraft para la producción de pulpa de celulosa (Cheremisinoff y Rosenfeld, 2010). De acuerdo con reportes previos de estaciones automáticas de monitoreo, en 2013 esta industria era responsable del 43.8% de las emisiones atmosféricas de SO₂ (2,954.1 Gg/año) (SUMA, 2015). De esta manera, tanto la reducción del contenido de clorofila como la aparición de síntomas de daños sobre el talo, pudieran ser consecuencia de las emisiones de SO₂ de esta industria.

Daños sobre la actividad fotosintética de los líquenes se han registrado en los alrededores de industrias papeleras. Holopainen (1983) observó daños ultraestructurales en las células del fotobionte y micobionte en líquenes creciendo a 4 km de una planta de celulosa y papel en Finlandia, atribuyéndolo principalmente a las emisiones de SO₂, NO_x y HF. Por su parte, Azevedo *et al.* (2012), determinaron un efecto negativo la acumulación de metales sobre la eficiencia del Fotosistema II en trasplantes de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale después de 180 días de exposición a 500 y 1000 m de una papelería.

No todas las especies de líquenes son igualmente sensibles a los mismos contaminantes, sino que cada una de ellas exhibe una sensibilidad específica (Gries, 1996). Además, se ha reconocido que la sensibilidad a la contaminación puede variar entre formas de crecimiento, siendo generalmente los líquenes costrosos los más tolerantes, seguidos de las formas foliosas; mientras que, los líquenes fruticosos, son incluidos entre los más sensibles (Brodo *et al.*, 2001). Diferentes especies del género *Usnea* son reconocidas por ser muy sensibles a la contaminación del aire (Brodo *et al.*, 2001; Hawksworth *et al.*, 2005). En particular, *U. ceratina* es una especie que se caracteriza por encontrarse en ambientes con bajos niveles de contaminación (Hawksworth y Rose, 1970; Nimis y Martellos, 2008; Escandón *et al.*, 2016).

Zambrano y Nash (2000) determinaron la sensibilidad de trasplantes de *U. ceratina* a la contaminación del aire de la ciudad de México. Después de 54 días de exposición, los trasplantes de esta especie mostraron una disminución en su habilidad para intercambiar CO₂ (fotosíntesis neta) y en su contenido de clorofila *b*, lo cual se relacionó a los altos niveles de contaminación por ozono (O₃) en la zona urbana.

De acuerdo con Bosserman y Hagner (1981) las características morfológicas del talo influyen sobre el grado de exposición de los líquenes al ambiente. Los líquenes fruticosos, como las especies del género *Usnea*, se caracterizan por crecer en forma de pequeños

“arbustos” formados por numerosos y delgados cilindros, que se unen al sustrato por un solo punto de fijación, lo cual implica que tengan una mayor superficie de área expuesta al aire. Por su parte, los líquenes foliosos como *Flavopunctelia*, suelen presentar un talo más aplanado y más adherido al sustrato, por lo que la superficie en contacto con el aire es menor (Bosserman y Hagner, 1981). De esta manera, las diferencias observadas en la vitalidad de las dos especies de líquenes aquí estudiadas, indicarían un efecto importante de sus características morfológicas sobre su respuesta a los efectos de la contaminación.

Entre los factores ambientales, el viento juega un papel muy importante en los patrones de distribución de los contaminantes (Conti, 2008). En el área de estudio, la mayor parte del año los vientos dominantes soplan desde el sureste y sur-sureste (ver Figura 2C), por lo que las direcciones noroeste y norte-noroeste representarían las principales zonas de dispersión de los contaminantes. Lo anterior coincide con los síntomas de daños observados en *U. ceratina*, los cuales fueron más frecuentes en los trasplantes expuestos en los sitios de monitoreo del norte y oeste.

5. Conclusiones

En este trabajo, se sugiere que el líquen fruticoso *U. ceratina* es una especie sensible a la contaminación del aire, ya que durante el periodo de exposición los trasplantes de esta especie mostraron una clara disminución en el contenido de clorofila y la presencia de mayores síntomas de daños sobre el talo, principalmente en los sitios de monitoreo más cercanos al área industrial. Por el contrario, los resultados indican que *F. praesignis* es una especie más tolerante, al responder menos rápido al estrés ocasionado por la contaminación del aire. Después del periodo de exposición los trasplantes de *F. praesignis* mostraron menores síntomas de daños sobre el talo, así como un incremento significativo en su contenido de clorofila.

El incremento en el contenido de clorofila en los trasplantes de *F. praesignis* estaría relacionado con diferentes factores como la estacionalidad, o bien, con un mecanismo de protección en respuesta a los niveles de contaminación. En *U. ceratina* dicha respuesta no existiría, o bien, se ve sobrepasada por la contaminación.

En el presente trabajo, no se pudo identificar de manera precisa que factores atmosféricos son responsables de los cambios en el contenido de clorofila y de los síntomas observados

en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina*. Sin embargo, parece ser que la vitalidad de ambas especies es afectada por la presencia de contaminantes tóxicos en la zona de estudio si bien, provenientes de la propia industria papelera o de otras fuentes, como la ciudad.

6. Agradecimientos

Los autores expresan un particular agradecimiento al Dr. Arnulfo García Blanco por facilitar la utilización del fluorómetro modulado para las mediciones de clorofila. Así mismo, se agradece a CONACyT por la beca otorgada para la realización del presente proyecto.

7. Referencias

- Azevedo, R. S. Fernández-Salegui A. B., Terrón-Alfonso, A., Soares, A. M. V. M. 2012. Biomonitoring atmospheric pollution from pulp mill industry using lichen transplants in central-littoral Portugal. En: Azevedo, R. S. Lichen biodiversity and biomonitoring of atmospheric pollution. Tesis de grado. Universidad de Aveiro. Departamento de Biología. España.
- Bajpai, R., Upreti, D. K., Nayaka, S., Kumari, B. 2010. Biodiversity, bioaccumulation and physiological changes in lichens growing in the vicinity of coal-based thermal power plant of Raebareli district, north India. *J. Hazard. Mater.* 174; 429-436.
- Batič, F. 2002. Bioindication of Sulphur Dioxide Pollution in Lichens. En; Kranner, I., Beckett, R. Varma, A. (eds.). *Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. Springer, Alemania. pp. 483-507.
- Boonpragob, K., Nash III, T. H. 1991. Physiological responses of the lichen *Ramalina menziesii* Tayl. to the Los Angeles urban environment. *Environ. Exp. Bot.* 31(2): 229-238.
- Bordado, J. C., Gómes, J. F. 1997. Pollutant atmospheric emissions from Portuguese Kraft pulp mills. *Sci. Total Environ.* 208: 139-143.
- Bosserman, R. W., Hagner, J. E. 1981. Elemental composition of epiphytic lichens from Okefenokee Swamp. *The Bryologist*, 84: 48-58.
- Brodo, I. M., Duran-Sharnoff, S., Sharnoff, S. 2001. *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven, Londres.

- Carreras, H. A., Gudiño, G. L., Pignata, M. L. 1998. Comparative biomonitoring of atmospheric quality in five zones of Córdoba city (Argentina) employing the transplanted lichen *Usnea* sp. *Environ. Pollut.* 103: 317-325.
- Carreras, H. A., Wannaz, E. D., Pérez, A. C., Pignata, M. L. 2005. The role of urban air pollutants on the performance of heavy metal accumulation in *Usnea amblyoclada*. *Environ. Res.* 90: 50-57.
- Catalayud, A., Sanz, M. J., Calvo, E., Barreno, E., Valle-Tascón, S. 1996. Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of Northern Castellon (Spain). *The Lichenologist*, 28(1): 49-65.
- Cervantes, L. Avila, O., Ruvalcaba, J. L., Miranda, J., Muñoz, R. 2008. The use of biomonitors and PIXE analysis in the study of air pollution in Mexico City. *X-Ray Spectrom.* 37: 156-162.
- Cheremisinoff, N. P., Rosenfeld, P. E. 2010. Sources of air emissions from pulp and paper mills. En: Cheremisinoff, N. P. y Rosenfeld, P. E. Best Practices in the Wood and Paper Industries. *Elsevier*. pp. 79-259.
- Chettri, M. K., Cook, C. M., Vardaka, E., Sawidis, T., Lanaras, T. 1998. The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environ. Exp. Bot.* 39: 1-10.
- Conti, M. E. 2008. Bioindicators and biomarkers for environmental quality and human exposure assessment: The sustainable world. Vol. 17, WIT. Southampton.
- Conti, M. E., Cecchetti, G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment: a review. *Environ. Pollut.* 114: 471-492.
- Conti, M. E., Pino, A., Botrè, F., Bocca, B., Alimonti, A. 2009. Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). *Ecotox. Environ. Safe.* 72 (4):1082-1089.
- EPA. 2002. Profile of the pulp and paper industry. 2nd ed. Sector Notebook Project.
- Escandón, D. D., Soto, M. E., Lücking, R., Silverstone, S., P. A. 2016. Corticolous lichens as environmental indicators of natural sulphur emissions near the sulphur mine El Vinagre (Cauca, Colombia). *The Lichenologist*, 48(2):147-159.
- Estrabou, C., Stiefkens, L., Hadid, M., Rodríguez J. M., Pérez A. 2004. Effects of air pollutants on morphology and reproduction in four lichen species in Córdoba, Argentina. *Ecología en Bolivia*, 39(2): 33-45.
- Fernández-Salegui, A. B., Terrón-Alfonso, A., Fos, S., Barreno, E. M. 2002. Síntomas de daños por contaminantes atmosféricos en *Parmelia sulcata* Tayl. en la zona de La Robla (León, España). *Lazaroa*, 23: 7-16.
- Garty, J. 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit. Rev. Plant. Sc.* 20: 309-371.

- Garty, J., Tamir, O., Hassid, I., Eshel, A., Cohen, Y., Karnieli A., Orlovsky, L. 2001. Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance in lichens exposed to air pollution. *Environmental Quality*, 30: 884-893.
- Gitelson, A. A., Buschmann, C., Lichtenthaler, H. K. 1999. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an accurate measure of the Chlorophyll Content in plants. *Remote Sens. Environ.* 69: 296–302.
- Gómez-Peralta, M., Chávez-Carmona A. 1995. Líquenes indicadores biológicos en el campo geotérmico Los Azufres, Michoacán, México. *Geotermia Revista Mexicana de Geoenergía*, 3: 137-143.
- Gómez-Peralta, M., Gómez-Reyes, V. M. 2007. Líquenes y musgos de Morelia relacionados con la calidad del aire. *Biológicas*, 9: 5-11.
- González, C. M., Casanovas S. S., Pignata M. L. 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Córdoba, Argentina. *Environ. Poll.* 91(3): 269-277.
- Gregorio-Cipriano, M. A., Gómez-Peralta, M., Álvarez, I. 2016. Líquenes cortícolas de las áreas urbanas y suburbanas de Morelia, Michoacán, México. *Bot. complut.* 40: 9-21
- Gries, C., Sanz M. J., Nash III, T. H. 1995. The effect of SO₂ fumigation on CO₂ gas exchange, chlorophyll fluorescence and chlorophyll degradation in different lichen species from western North America. *Cryptogam. Bot.* 5: 239-246.
- Gries, C. 1996. Lichens as indicators of air pollution. En: Nash III, T. H. (ed.). Lichen biology. Cambridge University Press, Nueva York, EUA. pp. 241-254.
- Hawksworth, D. L., Rose, F. 1970. Qualitative scale for estimating Sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, 227: 145-148.
- Hawksworth, D. L., Rose, F. 1976. Lichens as pollution monitors. Institute of Biology's Studies in Biology Vol. 66. Edward Arnold Publishers Ltd., Londres, Inglaterra.
- Hawksworth, D. L., Iturriaga, T., Crespo, A. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medioambientales en los trópicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 71-82.
- Henriksson, E., Pearson, L. C. 1981. Nitrogen fixation rate and chlorophyll content of lichen *Peltigera canina* exposed to Sulphur Dioxide. *American Journal of Botany*, 68: 680-684.
- Herrera-Campos, M, Pérez-Pérez, R. E., Nash III, T. H .2016. Lichens of Mexico. The Parmeliaceae: Keys, distribution and specimen descriptions. *Bibliotheca Lichenologica*, 110, J. Cramer, DE.
- Holopainen, T. H. 1983. Ultrastructural changes in epiphytic lichens, *Bryoria capillaris* and *Hypogymnia physodes*, growing near a fertilizer plant and a pulp mill in central Finland. *Ann. Bot. Fennici.* 20: 169-185.

- INEGI. 2013. Continuo de Elevaciones Mexicano (Nacional) resolución 15 m.
- INEGI. 2017. Conjunto de datos vectoriales de uso del suelo y vegetación escala 1:250 000, serie VI (Conjunto Nacional).
- LeBlanc, F., Rao, D. N. 1973. Effects of Sulphur Dioxide in lichens and moss transplants. *Ecology*, 54(3): 612-617.
- Mikhailova, I. 2002. Transplanted lichens for bioaccumulation studies. En: Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P.A. (eds.). *Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 301-304.
- Nash III, T. H., Ryan, B. D., Gries, C., Bungarts. F. 2002. Lichen flora of The Greater Sonoran Desert Region Vol. 1. Arizona State University, Tempe, Arizona, EUA.
- Nieboer, E., Richardson, D. H. S., Tomassini, F. D., 1978. Mineral uptake and release by lichens: an overview. *The Bryologist*, 81(2): 226-246.
- Nimis, P. l., Skert, N., Castello, M. 1999. Biomonitoraggio di metalli in Traccia tramite lichen in aree a rischio del Friuli-Venezia Giulia. *Studia Geobotanica*, 18: 3-49.
- Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A. (eds.). 2002. *Monitoring with Lichens—Monitoring lichens*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Nimis, P. L., Martellos, S. ITALIC 5.0, The Information System on Italian Lichens.
- Organismo Operador de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento de Morelia (OOAPAS). 2019. Datos estaciones metrológicas de Morelia: Mintzita periodo 2006-2019.
- Paoli, L., Pisani, T., Munzi, S., Gaggi, C., Loppi, S. 2010. Influence of sun irradiance and water availability on lichen photosynthetic pigments during a Mediterranean summer. *Biologia*, 65(5): 776-783.
- Paoli, L., Pisani, T., Guttová, A., Sardella, G., Loppi, S. 2011. Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: Relationship with the lichen diversity. *Ecotox. Environ. Safe*. 74(4): 650-657.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rao, D. N., LeBlanc, F. 1966. Effects of sulfur dioxide on the lichen alga, with special reference to chlorophyll. *The Bryologist*, 69 (1): 69-75.
- Richardson, D. H. S. 1992. Pollution monitoring with lichens. *Naturalists Handbooks* 19. The Richmond Publishing Co. Ltd. Gran Bretaña.
- Richardson, D. H. S., Nieboer, E. 1981. Lichens and pollution monitoring. *Endeavour*, New Series. 5(3): 127-133.
- Ronen, R. Galun. M. 1984. Pigment extraction from lichens with Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ. Exp. Bot.* 24(3): 239-245.

Sanz, M. J., Gries, C., Nash, T. H. 1992. Dose-response relationships for SO₂ fumigations in the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Ramalina fraxinea* (L.) Ach. *New Phytol.* 122: 313-319.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN). 2011. Temperatura media anual y precipitación anual (1902-2011). Atlas Climático Digital de México.

Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente del Gobierno del Estado de Michoacán (SUMA). 2015. Programa de Gestión para Mejorar la Calidad del Aire en el Estado de Michoacán 2015 – 2024. SEMARNAT, México. 140 p.

Sheridan, R. P., Sanderson, C., Richard K. 1976. Effects of Pulp Mill Emissions on Lichens in the Missoula Valley, Montana. *The Bryologist*, 79(2): 248-252.

Sujetoviene, G., Sliumpaite, I. 2013. Response of *Evernia prunastri* transplanted to an urban area in central Lithuania. *Atmos. Pollut. Res.* 4(3): 222-228.

Thompson, G. Swain, J. Kay, M., Forster, C. F. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technol.* 77: 275-286.

Vannini, A., Paoli, L., Nicolardi, V., Di Lella, A. L., Loppi, S. 2017. Seasonal variations in intracellular trace element content and physiological parameters in the lichen *Evernia prunastri* transplanted to an urban environment. *Acta Bot. Croat.* 76(2): 171–176.

Zambrano, G. A., Nash III, T. H. 2000. Lichens responses to short-term transplantation in Desierto de los Leones, Mexico City. *Environ. Pollut.* 107: 407-412.

5. CAPITULO II

Bioacumulación de elementos en trasplantes de líquenes epífitos en los alrededores de una industria papelera en Morelia (Michoacán, México).

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las emisiones de una industria papelera en la ciudad de Morelia, Michoacán, sobre la acumulación de trazas de elementos en dos especies de líquenes epífitos, *Flavopunctelia praesignis* y *Usnea ceratina*, trasplantadas en sus alrededores. Los resultados de acumulación fueron comparados con las concentraciones medidas en dos sitios control. Además, se evaluó el efecto de la distancia y la orientación desde la fuente de emisiones y mapas de distribución de los contaminantes fueron elaborados. Análisis de correlación y análisis clúster fueron utilizados para determinar las fuentes de origen en común de los elementos. Como resultados, trazas de 11 elementos (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V y Zn) fueron encontradas en los trasplantes de ambas especies de líquenes después de cuatro meses de exposición alrededor de la papelera. La mayoría de los elementos analizados (Al, Fe, Co, Cr, Mn, Ni, V) no variaron significativamente con respecto al control; sin embargo, mostraron una tendencia a presentar altos niveles de concentración cerca del área industrial. De las dos especies de líquenes, *F. praesignis* destacó por mostrar una mayor habilidad para acumular elementos que *U. ceratina*, lo cual podría estar relacionado con las diferencias en sus características morfológicas. Las concentraciones de los elementos no mostraron un patrón claro con la distancia de la industria papelera, lo cual sugiere un efecto importante de los vientos dominantes y la topografía. Además de la industria papelera, se identificaron otras fuentes de elementos (área urbana, zonas de cultivo, tráfico vehicular) en el área de estudio.

Palabras clave: *Flavopunctelia praesignis*, *Usnea ceratina*, emisiones, metales, fuentes de origen.

Abstract

The aim of this study was evaluate the effect of emissions from a paper industry in the city of Morelia (Michoacán, México) through the accumulation of trace elements in two species of epiphytic lichens *Flavopunctelia praesignis* and *Usnea ceratina* transplanted in their surroundings. The accumulation results were compared with the concentrations measured at two control sites. In addition, we evaluated the effect of distance and orientation from the source of emissions and we elaborated distribution maps of pollutants. Correlation analysis and cluster analysis were used to determine the sources of common origin of the elements. Traces of 11 elements (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V and Zn) were found in the transplants of both lichen species after four months of exposure around the paper industry. Most of the elements analyzed (Al, Fe, Co, Cr, Mn, Ni, V) did not vary significantly with respect to the control site, however, they showed a tendency to high levels of concentration close to the industrial area. *F. praesignis* showed a greater ability to accumulate elements than *U. ceratina*, this could be related to differences in their morphological traits. The concentration of elements dit not show a clear pattern with the distance from the paper industry which suggests an important effect of prevailing winds and topography. In addition to the paper industry, other sources of elements (urban area, agricultural areas, vehicular traffic) in the study area are indentify.

Keywords: *Flavopunctelia praesignis*, *Usnea ceratina*, emissions, metals, sources of origin.

1. Introducción

A diferencia de los métodos físicos y químicos, el biomonitorio de la calidad del aire representa una alternativa rápida y de bajo costo, que permite no sólo detectar la presencia de contaminantes atmosféricos, sino también evaluar sus efectos sobre organismos vivos y, a partir de ellos, hacer inferencias sobre la calidad del ambiente (Conti, 2008). De esta manera, las técnicas de biomonitorio pueden ayudar a la implementación de políticas ambientales sobre la contaminación del aire y su control (Pirintsos y Loppi, 2008).

Durante décadas, los líquenes han sido reconocidos como excelentes biomonitores de la calidad del aire, debido a su habilidad para acumular contaminantes atmosféricos (Nimis *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 2009; Kularatne y Freitas, 2013). A diferencia de las plantas, los líquenes carecen de raíces, por lo que su nutrición depende de la deposición atmosférica húmeda y seca (Nash, 1996; Loppi y Pirintsos, 2003). Así mismo, la ausencia de una cutícula o estomas permite que los contaminantes sean fácilmente absorbidos a través de toda su superficie (Conti y Cecchetti, 2001).

Los contaminantes pueden ser acumulados en forma de iones solubles o partículas insolubles (Richardson, 1992; Bargagli y Mikhailova, 2002), y existen diferentes mecanismos a través de los cuales los líquenes pueden acumularlos: (1) sobre la superficie del talo o en espacios intercelulares, (2) de forma extracelular por intercambio catiónico o (3) al interior de la célula (Nieboer *et al.*, 1978; Garty, 2001; Bargagli y Mikhailova, 2002).

Los líquenes son capaces de acumular indiscriminadamente una amplia gama de contaminantes (metales pesados, S, N, fluoruros, radionucleidos), los cuales en muchas ocasiones son acumulados a niveles por encima de sus propias necesidades fisiológicas (Bačkor y Loppi, 2009). Dicha tolerancia ha sido relacionada con la ocurrencia de sucesivas fases de acumulación y pérdida de partículas a través del tiempo, hasta que las concentraciones de los contaminantes en el talo alcanzan un equilibrio con los niveles promedio de contaminación ambiental (Kularatne y De Freitas, 2013). De esta manera, la composición química de los líquenes refleja la disponibilidad de elementos presentes en el ambiente (Bargagli y Mikhailova, 2002) y nos brinda información sobre sus variaciones espaciales y temporales (Paoli *et al.*, 2015).

Durante la producción de papel, el pulpeo químico constituye una fuente importante de contaminantes atmosféricos, al ser un proceso llevado a cabo a altas presiones y

temperaturas (Cheremisnoff y Rosenfeld, 2010). Diferentes estudios de biomonitoreo en los alrededores de papeleras, han demostrado el efecto de sus emisiones sobre la bioacumulación de elementos como metales, N y S en líquenes nativos y trasplantes (Halonen *et al.*, 1993; Kytömaa *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2012).

Al suroeste de la ciudad de Morelia, se encuentra ubicada una industria papelera Kraft la cual es responsable de emitir diferentes contaminantes a la atmósfera (SUMA, 2015). Sin embargo, no se cuenta con un monitoreo continuo de la calidad del aire en la zona. El principal objetivo de este trabajo fue determinar la bioacumulación de elementos en trasplantes de dos especies de líquenes epifitos, *Flavopunctelia praesignis* (Nyl.) Hale y *Usnea ceratina* Ach., en los alrededores de una industria papelera. La finalidad de ello fue en evaluar en qué medida dicha industria contribuye a la contaminación del aire del área de estudio.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

El área de estudio se encuentra ubicada al suroeste de la ciudad de Morelia, México, y comprende las instalaciones de dos plantas de pulpa de celulosa y papel Kraft (Figura 1). El área cuenta con una superficie aproximada de 0.54 km² y se ubica entre las coordenadas 19.65°N y 19.64°S de latitud, y 101.27°W y 101.26°E de longitud, a una altitud de 1896 m.

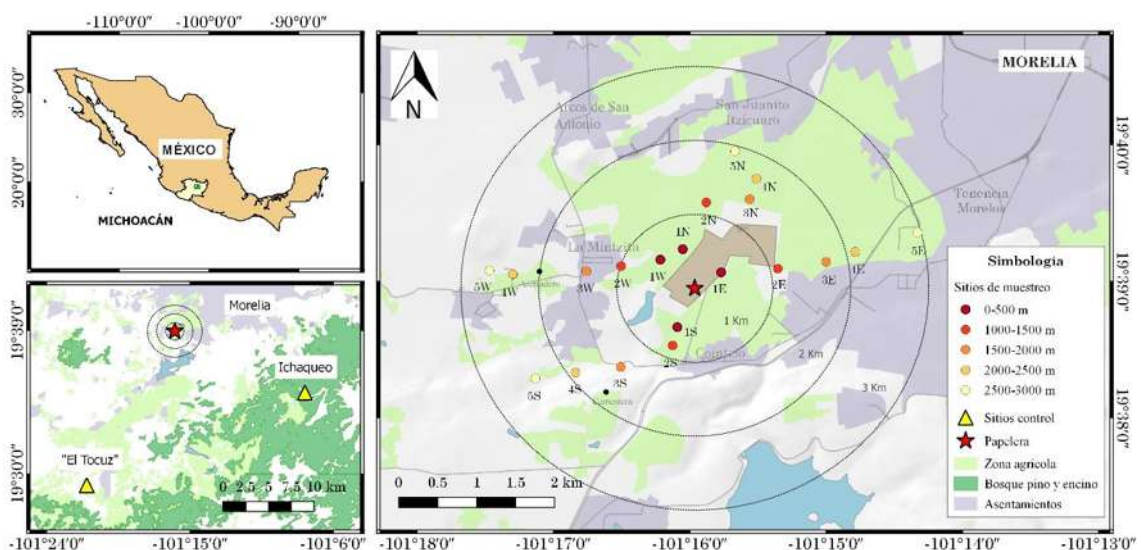


Figura 1. Ubicación del área de estudio y sitios de monitoreo. Se muestra detalle del relieve (INEGI, 2013).

La topografía corresponde a llanuras, aunque se observan pequeñas elevaciones hacia el oeste y sur (INEGI, 2013). El área es cruzada por algunos caminos de terracería y una carretera federal (MEX14).

El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (Figura 2 A-C). La temperatura media anual de 17.8 °C, con mínima de 13.7°C en invierno y máxima de 20.8 °C en verano. La precipitación anual oscila entre 600-800 mm y se distribuye entre mayo y septiembre (SMN, 2011). Los vientos dominantes soplan desde el sureste (OOAPAS, 2019).

De acuerdo con reportes previos de estaciones automáticas de monitoreo, en 2013 esta industria era responsable del 43.8% de las emisiones atmosféricas de SO₂ (2,954.1 Gg/año), así como del 18% (431.2 Gg/año) y 23% (370.1 Gg/año) de las correspondientes a PM₁₀ y PM_{2.5}, respectivamente (SUMA, 2015).

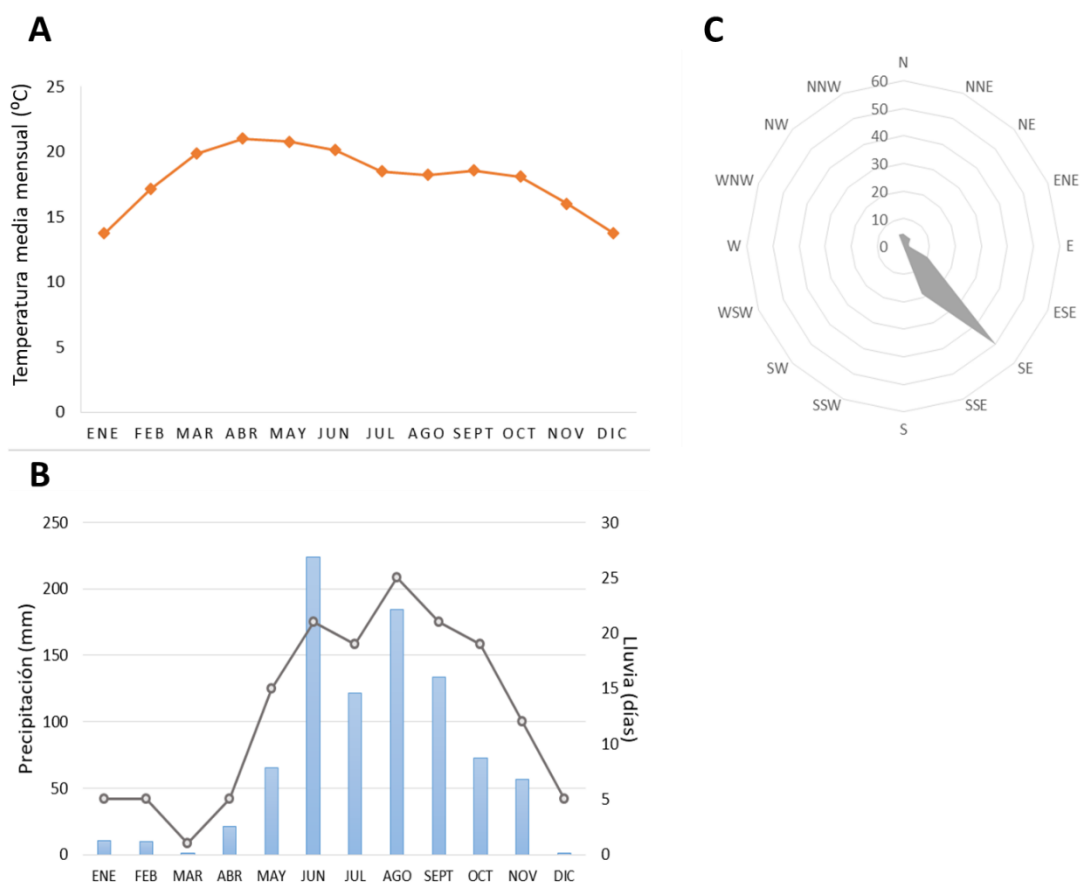


Figura 2. Datos climáticos provenientes de la estación meteorológica cercana al área de estudio (Mintzita). A) Temperatura media mensual °C, B) Precipitación mensual (mm) y no. de días de lluvia, C) Dirección y porcentaje de vientos dominantes (SMN, 2011; OOAPAS, 2019).

2.2. Diseño de muestreo

En el área de estudio se seleccionaron 20 sitios ubicados en las cuatro direcciones cardinales (N, S, E, W). En un principio, se pretendió separar estos sitios de monitoreo por una determinada distancia, sin embargo, esto no fue posible debido a las condiciones de uso de suelo y topografía del área de estudio, por lo que los sitios fueron situados lo más uniformemente posible, de tal manera que la distancia a la fuente de contaminación incrementara (Figura 1). En cada sitio se seleccionaron tres árboles de las especies *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. y *Salix babylonica* L., que sirvieron de sustrato para los trasplantes de líquenes.

2.3. Recolección de muestras y trasplante

El trasplante de líquenes nativos desde áreas relativamente limpias o con bajos niveles de contaminantes hacia áreas con problemas de contaminación, es una técnica que nos permite analizar la bioacumulación de uno o varios contaminantes en el talo durante un determinado periodo de tiempo (Conti y Ceccheti, 2001). Entre sus ventajas, este método nos permite estandarizar el diseño de muestro, establecer el periodo de exposición y calcular tasas de enriquecimiento al conocer valores previos a la exposición (Bargagli y Mikhailova, 2002).

El líquen folioso *Flavopunctelia praesignis* y el líquen fruticoso *Usnea ceratina* son especies comunes en zonas montañosas de bosques templados de coníferas (*Pinus* sp.) y de encino (*Quercus* sp.), así como en bosques bajos y de climas más secos (Nash *et al.*, 2002; Herrera-Campos *et al.*, 2016). Ambas especies fueron seleccionadas por su fácil recolección, identificación y por distribuirse en bosques de los alrededores de Morelia y municipios cercanos (Gregorio-Cipriano *et al.*, 2016). Otros estudios en áreas contaminadas de México han empleado especies del género *Usnea* y *Flavopunctelia* como biomonitores (Gómez-Peralta y Chávez-Carmona, 1995; Zambrano y Nash, 2000; Cervantes *et al.*, 2008).

Los talos de ambas especies de líquenes se recolectaron de dos localidades control en marzo de 2018. Las muestras de *F. praesignis* se recolectaron principalmente en el Área Voluntaria para la Conservación (AVC) “El Tocuz” (19.48°N, 101.35°W), mientras que, las de *U. ceratina* en la localidad de Ichaqueo (19.58°N, 101.13°W), ubicadas a 32 y 16.5 km del área de estudio, respectivamente. Ambas localidades presentan un clima templado,

con temperaturas medias anuales de 15 °C y precipitaciones >1000 mm anuales (SMN, 2011) y son dominadas por bosques de pino y encino (INEGI, 2017).

Durante la recolecta, se procuró que las muestras tuvieran el mismo tamaño y que se encontraran en buen estado. Las recolectas se hicieron principalmente en árboles de encino, y para evitar la variación dada por las diferencias de sustrato en el área de estudio, los líquenes fueron recolectados con parte de la corteza o de la rama que los sostuviera (Mikhailova, 2002).

En el área de estudio, sobre cada árbol se colocaron cinco trasplantes de cada especie, en total 15 por sitio de monitoreo. Los trasplantes fueron colocados dentro de pequeñas redes de fibra de plástico a manera de sobres (20 x 20 cm y 1 mm² de cuadrícula) y fijados a la corteza a una altura de 2 m del suelo, orientados en dirección a la papelera. Como control, otro grupo de trasplantes (n=15) fueron colocados bajo las mismas condiciones en los sitios de recolecta. Las concentraciones de elementos medidas en los talos de ambas especies trasplantados en su hábitat fueron utilizados como referencia para determinar los respectivos cambios en el área de estudio. Los líquenes fueron expuestos durante un período de 127 días, en concreto de abril a agosto de 2018.

2.4. Bioacumulación de elementos: Análisis químico

Al terminar el periodo de exposición, los trasplantes fueron removidos y transportados al laboratorio en bolsas de papel. En el laboratorio, las muestras fueron secadas al aire y limpiadas cuidadosamente con pinzas bajo el microscopio estereoscópico para remover cualquier material extraño del talo como partículas de polvo, restos de corteza, artrópodos, otras especies de líquenes o musgos. En el caso de *F. praesignis* únicamente se tomó la parte periférica (aproximadamente 5 mm desde la punta de los lóbulos) para los análisis, siendo esta la parte más joven del talo en los líquenes foliosos (Nimis *et al.*, 2001).

Se tomaron 3 muestras por sitio de monitoreo. Cada muestra consistió en la mezcla de varios talos provenientes de cada árbol, esto para ambas especies. Las muestras de líquenes fueron inmersas en nitrógeno líquido hasta quebrarse, y posteriormente, pulverizadas y homogenizadas con un mortero de cerámica. Cerca de 0.20 g de cada muestra del liquen en polvo fueron digeridas con 5 ml de HNO₃ (grado ultrapuro) en un sistema de digestión por microondas (UltraWave, Milestone), primeramente 20 min y

finalmente 10 min a 220 °C, 1500 W y 110 bares. Una vez digeridas, las muestras se enfriaron y aforaron con agua desionizada a un volumen de 25 y 10 ml. Posteriormente, fueron filtradas a través de filtros de 45 µm y almacenadas en frascos a 4 °C hasta su análisis.

Las concentraciones de 14 elementos (Al, As, Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, V, y Zn) fueron determinadas por la técnica ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, iCAP Qc) y expresadas sobre la base de peso seco (mg kg⁻¹). El instrumento fue optimizado previamente al análisis de muestras con la ayuda de estándares externos e internos, y se elaboró una curva de calibración.

Para determinar la reproducibilidad del experimento, muestras al azar fueron analizadas por duplicado. La calidad analítica fue verificada mediante el análisis de dos Materiales de Referencia Certificados (MRC), BCR-482 (liquen) de la Comisión de la Comunidad Europea y 1573^a (Tomatoe Leaves) del NIST. Como control de calidad, las muestras se analizaron por bloques ($n=15$), incluyendo los materiales de referencia, además de un blanco reactivo (HNO₃) para monitorear posible aportación de contaminantes. La precisión del análisis fue estimada por un coeficiente de variación <10%.

2.5. Análisis de datos

La distribución normal de los datos fue evaluada mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados a normales utilizando la función de logaritmo. En el caso de no seguir una distribución normal, los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas.

La acumulación de elementos fue comparada entre a) sitios de trasplante (alrededor de la papelera vs. sitios control) y b) especies (*F. praesignis* y *U. ceratina*). Las diferencias significativas entre grupos fueron analizadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía o por medio de Modelos Lineales Generalizados (MLG), cuando las variables respuesta no se distribuían normalmente. El efecto de la orientación y la distancia de los sitios de monitoreo sobre la concentración de los diferentes elementos se evaluó mediante un Análisis de Covarianza (ANCOVA), en el que también se analizó la interacción entre los factores. Para las variables sin normalidad se emplearon MLG.

De haber diferencias significativas ($p < 0.05$) se realizaron pruebas posteriores paramétricas (Tukey test) o no paramétricas (Duncan Test). Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa estadístico R v. 3.4.4 (R Core Team, 2018).

Elementos que muestran una estrecha correlación entre sí, comúnmente provienen de una misma fuente de origen (Halonen *et al.*, 1993; Bozkurt, 2017). Las correlaciones entre los diferentes elementos se evaluaron mediante un análisis de correlación de Spearman. Asimismo, para determinar las similitudes o diferencias en los patrones de acumulación de los elementos en los sitios de monitoreo se realizó un análisis de clúster (Bargagli y Nimis, 2002) utilizando el programa SPSS v. 11.5 (SPSS Inc., 2003). Para ello, se empleó una técnica de clúster jerárquico con un método de ligando promedio entre grupos y el cálculo de la distancia euclídea entre clústeres.

La distribución espacial de los elementos en el área de estudio fue analizada a través de mapas utilizando el programa SURFER (Golden Software Inc.) y como método de interpolación se seleccionó *kriging* (Paoli *et al.* 2011). Se elaboraron mapas de isocontaminación para cada elemento, así como mapas de contaminación total y de toxicidad potencial (Nimis *et al.*, 1999). Para los mapas de contaminación total se consideró la concentración de los diferentes elementos en todos los sitios de monitoreo en el área de estudio; mientras que, para los de toxicidad potencial solo se incluyeron aquellos elementos potencialmente tóxicos para la salud humana como el As, Cr, Cd, Cu, Ni, V y Zn (Nimis *et al.*, 1999). Para ambos tipos de mapas, los datos de concentración de los diferentes elementos fueron estandarizados (sobre una escala de 0 a 1) de acuerdo con el método propuesto por Gasparo *et al.* (1989).

3. Resultados

3.1. Bioacumulación de elementos

Las concentraciones de los elementos encontrados en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* expuestos alrededor de la industria papelera y los sitios control después del período de exposición se muestran en los Tablas 1 y 2. De los 14 elementos analizados, Ag, Sb y Pb se encontraron por debajo de sus límites de detección en la mayoría de las muestras de líquenes, por lo que no fueron incluidos en los análisis posteriores. Entre los elementos acumulados encontramos metales como el Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V, Zn, y metaloides como el As.

En ambas especies de líquenes, el Al fue acumulado en mayor cantidad (873.52 mg kg⁻¹ *F. praesignis* y 678.81 mg kg⁻¹ en *U. ceratina*) seguido del Fe (558.35 mg kg⁻¹ *F. praesignis* y 363.17 mg kg⁻¹ en *U. ceratina*); mientras que, el Cd tuvo las menores concentraciones (0.26 mg kg⁻¹ *F. praesignis* y 0.13 mg kg⁻¹ en *U. ceratina*).

En *F. praesignis*; a excepción del Cd y Zn, el resto de las concentraciones de elementos no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los trasplantes expuestos alrededor de la industria papelera y los localizados en el sitio control (Figura 3). Sin embargo, la mayoría de ellos (As, V, Co, Cr, Fe y Ni) mostraron una tendencia a ser acumulados en el área industrial. En cuanto al Cd, este se acumuló en mayor medida alrededor de la papelera, en las orientaciones norte y sur; mientras que, el Zn mostró mayores niveles de acumulación en el sitio control (Figura 3).

En el caso de *U. ceratina*, las concentraciones de Al, As, Cd, Cu y Zn mostraron diferencias ($p > 0.05$) con las registradas en el sitio control (Figura 4). El Cd y Cu se caracterizaron por presentar mayores niveles de concentración en los trasplantes expuestos alrededor de la industria papelera. Tanto el Al, As y Zn fueron significativamente más altos en el sitio control en comparación con lo observado en algunos sitios de monitoreo en el área de estudio. Otros elementos como el Co, Cr, Ni y Mn mostraron una tendencia a presentar niveles de concentración altos en las inmediaciones del área industrial (Figura 4).

Tabla 1. Concentración de elementos (mg kg⁻¹) en los trasplantes de *F. praesignis* (media ± desviación estándar) alrededor de la papelera después de cuatro meses de exposición. Se muestran los datos del sitio control. 1-5=Sitios de monitoreo; N=Norte, S=Sur, E= Este, W=oeste.

Sitio	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	V	Zn
1N	696.6 ± 240.0	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.3	3.6 ± 1.1	364.0 ± 126.9	86.8 ± 32.7	0.9 ± 0.2	2.5 ± 0.9	33.8 ± 18.1
2N	499.4 ± 138.9	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	2.9 ± 0.5	267.6 ± 67.1	131.7 ± 19.0	0.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	43.6 ± 8.1
3N	717.5 ± 105.1	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.3	5.9 ± 3.5	385.1 ± 45.7	93.9 ± 9.3	0.9 ± 0.3	2.5 ± 0.3	36.3 ± 2.4
4N	901.1 ± 80.1	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.5	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	8.5 ± 6.0	468.5 ± 29.5	53.9 ± 5.7	1.1 ± 0.2	3.2 ± 0.1	47.64 ± 0.0
5N	1188.4 ± 348.4	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.6	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.8	4.8 ± 0.0	673.0 ± 201.5	56.3 ± 17.9	1.4 ± 0.3	4.0 ± 0.5	54.7 ± 3.9
1S	990.7 ± 88.1	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.8	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.1	4.3 ± 1.3	539.8 ± 78.1	102.0 ± 7.5	0.9 ± 0.0	3.4 ± 0.2	21.6 ± 1.9
2S	839.3 ± 40.9	0.3 ± 0.0	1.0 ± 0.7	0.4 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.7 ± 2.2	473.5 ± 27.6	111.7 ± 33.6	0.8 ± 0.0	2.9 ± 0.2	20.6 ± 14.5
3S	954.9 ± 122.9	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.5	0.5 ± 0.0	1.9 ± 0.2	2.1 ± 2.2	597.8 ± 32.2	99.4 ± 15.5	1.1 ± 0.4	3.4 ± 0.1	24.8 ± 25.8
4S	737.3 ± 259.6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.5	5.1 ± 1.0	544.3 ± 184.3	75.3 ± 38.0	1.1 ± 0.1	2.9 ± 0.7	56.6 ± 8.5
5S	800.4 ± 172.5	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.1 ± 1.2	4.7 ± 0.9	574.2 ± 130.6	103.1 ± 20.2	1.0 ± 0.3	3.1 ± 0.6	53.1 ± 5.6
1E	784.7 ± 106.5	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.4	4.3 ± 1.1	562.6 ± 58.3	86.9 ± 25.4	1.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3	31.3 ± 5.2
2E	500.4 ± 37.9	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.4 ± 1.2	4.0 ± 1.1	354.8 ± 21.5	55.3 ± 7.2	0.9 ± 0.8	2.1 ± 0.1	25.0 ± 2.3
3E	1150.2 ± 958.4	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.6	0.8 ± 0.8	5.6 ± 1.8	808.0 ± 685.8	93.3 ± 56.7	0.6 ± 0.5	4.5 ± 3.2	49.5 ± 24.9
4E	760.2 ± 217.8	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.0	1.8 ± 0.5	5.6 ± 1.7	532.3 ± 152.9	59.6 ± 15.0	1.9 ± 1.3	3.2 ± 0.4	36.5 ± 5.4
5E	1141.4 ± 651.4	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.3	6.0 ± 0.7	783.7 ± 500.7	144.7 ± 42.1	1.5 ± 0.6	4.1 ± 2	39.3 ± 9.9
1W	927.3 ± 323.5	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.2	2.1 ± 0.8	5.6 ± 1.6	668.9 ± 262.1	143.2 ± 67.2	1.4 ± 0.3	3.5 ± 0.9	51.8 ± 9.7
2W	817.6 ± 270.4	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	4.9 ± 0.6	521.7 ± 186.1	92.8 ± 32.4	1.2 ± 0.2	3.2 ± 0.5	47.5 ± 11.3
3W	1122.0 ± 511.3	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.1 ± 1.1	1.7 ± 0.8	5.4 ± 1.5	755.0 ± 356.5	109.3 ± 23.8	1.5 ± 0.6	4.1 ± 1.6	47.9 ± 4.5
4W	1090.9 ± 128.3	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.6	11.0 ± 8.8	670.7 ± 80.9	71.2 ± 19.7	1.3 ± 0.2	4.1 ± 0.4	58.5 ± 2.6
5W	952.9 ± 141.6	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.6	6.4 ± 0.7	601.7 ± 92.7	125.6 ± 85.5	1.6 ± 0.4	3.7 ± 0.5	54.4 ± 6.0
mín.	350.05	0.03	0.03	0.21	0.08	0.11	195.87	42.23	0.07	1.29	3.37
máx.	2241.71	0.52	1.50	2.44	2.64	12.81	1590.84	223.22	3.43	8.22	78.28
\bar{X}	873.5 ± 341.0	0.03 ± 0.1	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.3	1.2 ± 0.7	4.8 ± 2.0	558.3 ± 245.6	95.9 ± 40.1	1.1 ± 0.5	3.2 ± 1.1	40.9 ± 16.2
Control	932.1 ± 428.22	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.7 ± 1.0	5.8 ± 2.1	587.4 ± 269.7	146.4 ± 106.2	1.3 ± 0.5	3.3 ± 1.2	62.2 ± 13.9

Tabla 2. Concentración de elementos (mg kg⁻¹) en *U. ceratina* (media ± desviación estándar) expuestos alrededor de la papelera después de cuatro meses de exposición. Se muestran los datos del sitio control. 1-5=Sitios de monitoreo; N=Norte, S=Sur, E= Este, W=oeste.

Sitio	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	V	Zn
1N	615.9 ± 606.7	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.3	1.2 ± 1.2	4.1 ± 3.1	414.2 ± 420.0	286.4 ± 213.8	1.1 ± 0.9	2.8 ± 2.2	58.8 ± 40.0
2N	995.1 ± 290.7	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.7 ± 0.4	3.1 ± 0.6	526.1 ± 126.0	531.1 ± 219.4	1.4 ± 0.1	2.8 ± 0.2	79.0 ± 31.3
3N	1121.3 ± 909.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.8	2.0 ± 0.7	3.5 ± 0.4	589.4 ± 426.0	336.1 ± 308.0	1.5 ± 0.4	3.0 ± 1.5	63.6 ± 34.8
4N	437.8 ± 29.6	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	6.9 ± 2.0	252.4 ± 40.2	68.7 ± 38.9	0.9 ± 0.0	2.0 ± 0.0	62.1 ± 0.1
5N	741.3 ± 650.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.4	1.1 ± 0.6	4.4 ± 3.1	385.1 ± 339.3	115.3 ± 47.8	1.3 ± 0.4	2.2 ± 1.2	76.7 ± 40.4
1S	277.3 ± 30.8	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.3	2.8 ± 0.1	155.5 ± 26.3	141.2 ± 132.0	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.3	58.6 ± 16.1
2S	284.3 ± 33.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.3	2.6 ± 0.4	194.1 ± 34.6	133.9 ± 53.2	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	68.2 ± 23.3
3S	457.5 ± 95.8	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.7	3.7 ± 1.5	306.2 ± 71.4	134.4 ± 40.6	1.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	55.3 ± 15.4
4S	604.1 ± 188.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.3 ± 0.9	4.3 ± 0.9	387.6 ± 147.1	255.2 ± 94.6	1.2 ± 0.4	2.5 ± 0.8	94.2 ± 29.2
5S	465.5 ± 27.7	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	3.7 ± 0.2	257.3 ± 39.4	299.1 ± 98.0	0.8 ± 0.0	1.9 ± 0.0	79.9 ± 5.8
1E	513.1 ± 215.4	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	2.8 ± 0.6	280.2 ± 105.4	160.8 ± 95.0	0.7 ± 0.2	1.8 ± 0.5	35.1 ± 11.7
2E	492.1 ± 217.5	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	2.2 ± 1.0	253.8 ± 105.5	177.1 ± 107.1	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.7	18.7 ± 8.5
3E	841.7 ± 809.3	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.0	5.0 ± 0.9	394.7 ± 312.3	204.6 ± 34.4	1.1 ± 0.1	2.5 ± 1.3	45.7 ± 7.1
4E	1086.2 ± 219.6	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	4.1 ± 0.8	515.8 ± 101.2	264.1 ± 28.0	0.9 ± 0.1	3.0 ± 0.6	43.2 ± 7.8
5E	588.6 ± 166.5	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.7 ± 0.2	3.5 ± 1.6	315.6 ± 87.4	174.3 ± 115.6	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.4	30.3 ± 14.3
1W	1465.9 ± 1052.5	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.5	1.7 ± 0.8	4.6 ± 2.2	739.1 ± 487.5	177.2 ± 91.8	1.5 ± 0.7	3.7 ± 2.1	51.3 ± 17.7
2W	696.2 ± 373.8	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.4	4.2 ± 1.0	355.5 ± 185.5	209.9 ± 68.8	1.0 ± 0.3	2.3 ± 0.8	63.9 ± 14.0
3W	577.7 ± 203.7	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.0	298.6 ± 77.3	219.0 ± 105.9	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.4	41.1 ± 6.8
4W	652.9 ± 210.5	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.2	3.0 ± 0.8	343.3 ± 111.6	149.3 ± 68.0	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.5	48.4 ± 9.4
5W	602.2 ± 215.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.5	3.1 ± 0.3	269.6 ± 16.2	203.8 ± 133.9	0.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	65.0 ± 5.4
mín.	98.37	0.03	0.02	0.07	0.22	0.99	76.14	38.92	0.21	0.78	9.23
máx.	2284.20	0.55	0.33	1.18	2.61	8.3	1059.43	773.85	2.15	5.29	118.79
\bar{x}	678.8 ± 467.5	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.6	3.6 ± 1.4	363.1 ± 225.9	216.2 ± 145.5	0.9 ± 0.4	2.2 ± 1.0	56.0 ± 23.4
Control	1052.9 ± 531.7	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.6	2.6 ± 0.3	465.1 ± 160.5	259.0 ± 126.3	1.0 ± 0.4	2.5 ± 0.9	66.9 ± 20.6

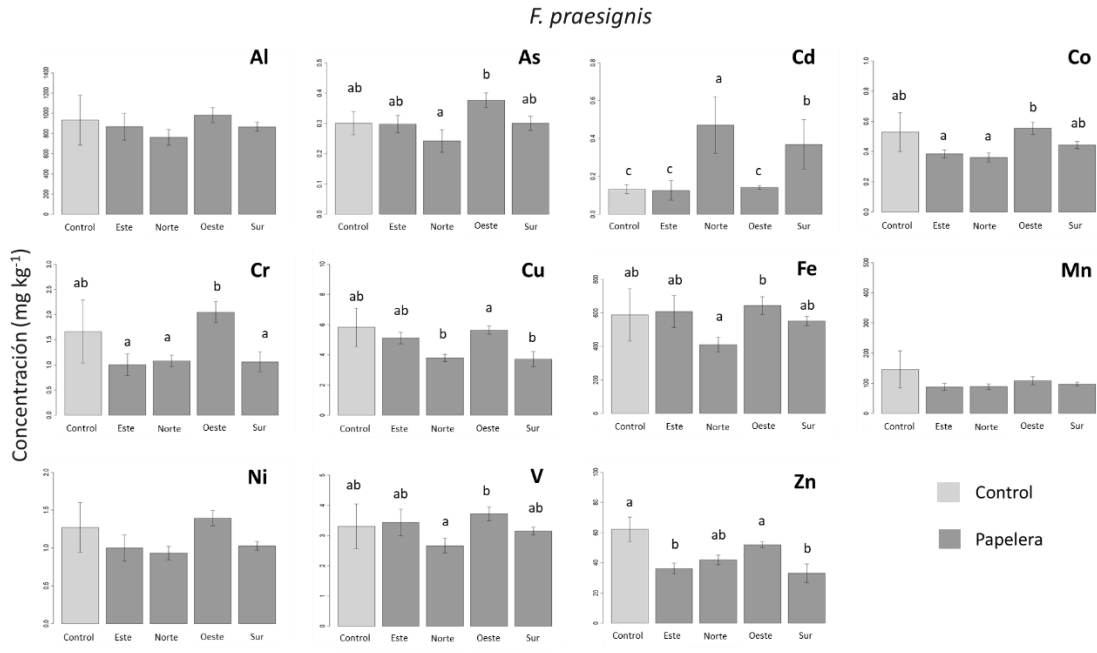


Figura 3. Concentración de elementos en los trasplantes de *F. praesignis* en el sitio control y en las orientaciones donde se ubicaron sitios de monitoreo alrededor de la industria papelera después de cuatro meses de exposición. Las barras con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de trasplantes.

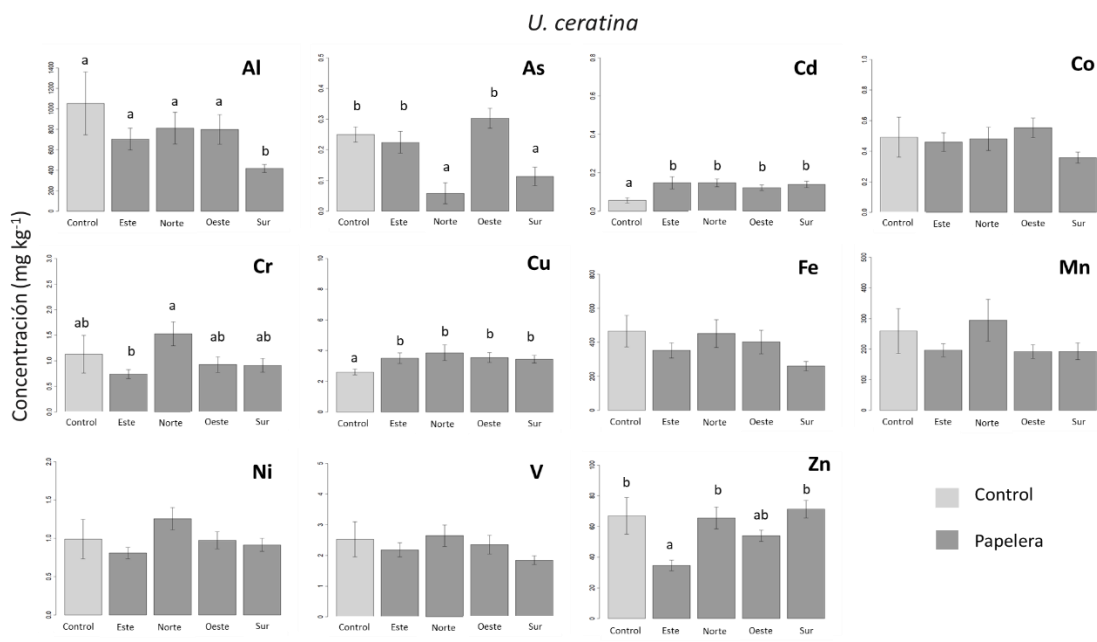


Figura 4. Concentración de elementos en los trasplantes de *U. ceratina* en el sitio control y en las orientaciones donde se ubicaron sitios de monitoreo alrededor de la industria papelera después de cuatro meses de exposición. Las barras con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de trasplantes.

Las concentraciones de la mayoría de los elementos (excepto Co, Cr y Ni) variaron significativamente ($p < 0.0001$) entre las dos especies de líquenes. Al, As, Cd, Fe, Ni y V fueron acumulados en mayor medida por *F. praesignis*, mientras que, el Zn y Mn por *U. ceratina* (Figura 5).

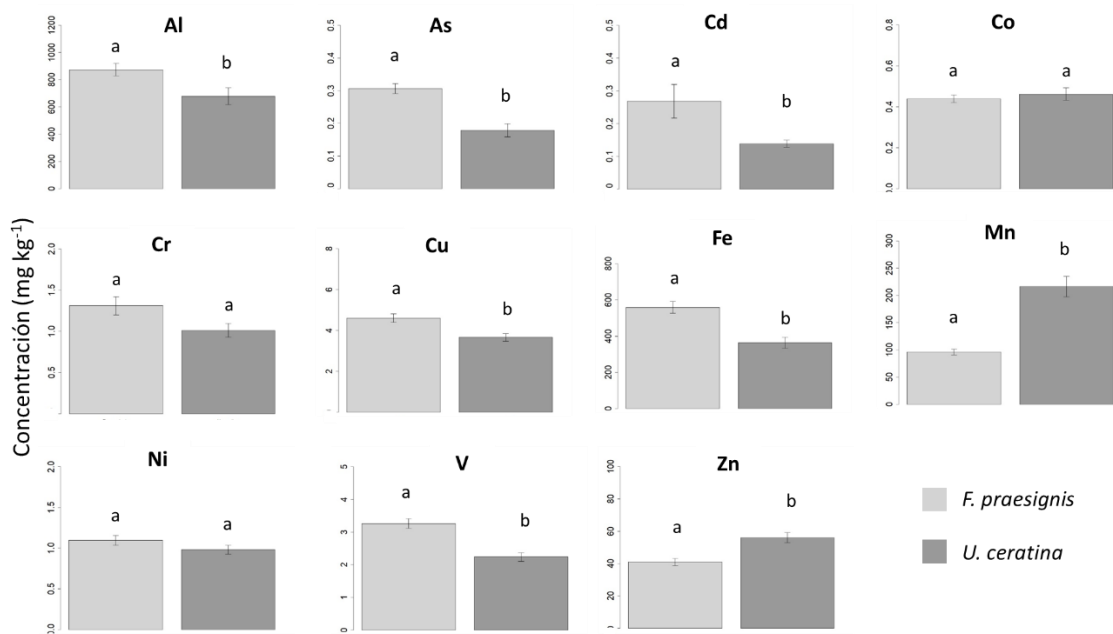


Figura 5. Acumulación de elementos en *F. praesignis* y *U. ceratina* después de cuatro meses de exposición. Las barras con letras minúsculas diferentes indican variaciones significativas ($p < 0.05$) en la acumulación de elementos entre ambas especies de líquenes.

La acumulación de As, Co, Cu, Fe, V y Zn varió con la distancia y orientación en la que fueron expuestos los trasplantes de *F. praesignis* alrededor de la industria papelera (Tabla 3). Las concentraciones de la mayoría de estos elementos fueron incrementando conforme la distancia desde la fuente de emisiones aumentaba (Figura 6).

En el caso de As y Zn, se observó una interacción entre ambos factores (distancia y orientación), es decir, que el efecto de la distancia sobre la acumulación de estos elementos varió entre las diferentes orientaciones. La concentración de As fue en promedio más alta en los trasplantes de *F. praesignis* colocados a 500 m de la papelera en comparación con lo observado en las otras direcciones. Por su parte, el Zn mostró un incremento con la distancia en todas las direcciones, aunque con algunas variaciones (Figura 6).

Tabla 3. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) para probar el efecto de la distancia y la orientación de la industria papelera sobre la concentración de elementos (mg kg⁻¹) en los trasplantes de *F. praesignis* después de cuatro meses de exposición. Los valores en negrita y con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$). (*) Elementos sin distribución normal analizados mediante un MLG, representándose el valor de “Chi cuadrada” (χ^2).

<i>F. praesignis</i>									
	Distancia (Dist)			Orientación (Orient)			Dist:Orient		
	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
Al	3.32	1,49	0.07	1.40	3,49	0.25	1.93	3,49	0.13
As	9.41	1,49	<0.01*	3.40	3,49	0.02*	3.52	3,49	0.02*
Cd (*)	0.57	1,49	0.44	12.44	3,49	<0.01*	6.25	3,49	0.09
Co	7.78	1,49	<0.01*	7.23	3,49	<0.01*	1.97	3,49	0.13
Cr	3.39	1,49	0.07	5.33	3,49	<0.01*	1.87	3,49	0.14
Cu	15.98	1,49	<0.01*	5.25	3,49	<0.01*	0.18	3,49	0.9
Fe	6.15	1,49	0.01*	3.51	3,49	0.02*	1.14	3,49	0.34
Mn	0.03	1,49	0.85	0.95	3,49	0.41	0.01	3,49	0.12
Ni	5.99	1,49	0.01*	2.57	3,49	0.06	0.33	3,49	0.79
V	4.81	1,49	0.03*	3.45	3,49	0.02*	2.08	3,49	0.11
Zn	18.17	1,49	<0.01*	15.90	3,49	<0.01*	4.00	3,49	0.01*

El Ni también fue un elemento que incremento su concentración con la distancia de exposición; mientras que, el Cd y Cr, únicamente variaron entre orientaciones (Tabla 3). Las concentraciones de estos dos elementos fueron significativamente más altas al norte y oeste de la papelera, respectivamente (Figura 6). Las diferencias observadas no fueron significativas ($p > 0.05$) para el Al y Mn.

En los trasplantes de *U. ceratina*, solamente las concentraciones de As y Mn variaron con la distancia y la orientación de los sitios de monitoreo (Tabla 4). La acumulación de As incremento significativamente con la distancia entre las diferentes orientaciones, a excepción de los trasplantes colocados en la dirección oeste, los cuales mostraron una mayor concentración de As en los sitios de monitoreo más cercanos a la industria. De igual manera, el Mn fue acumulado mayormente en los trasplantes colocados a 500 m de la papelera, pero en dirección norte (Figura 7).

Las concentraciones de Cr y Zn variaron entre las diferentes orientaciones (Tabla 4). El Cr fue significativamente mayor en los trasplantes de *U. ceratina* expuestos al norte en comparación con las otras direcciones; mientras que, el Zn mostró mayores niveles de acumulación hacia el norte y sur (Figura 7). En el resto de los elementos (Al, Cd, Co, Cu, Fe, Ni y V) no se observaron diferencias significativas (Tabla 4).

F. praesignis

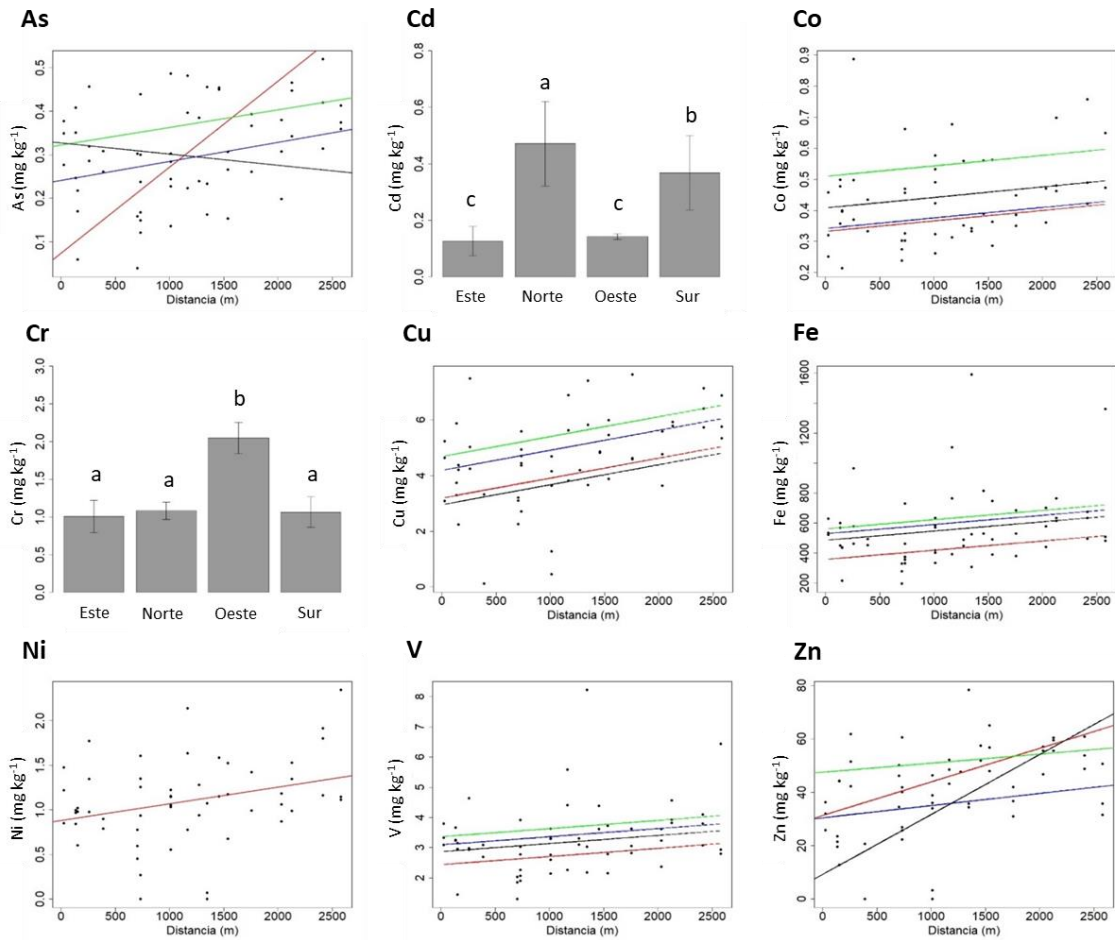


Figura 6. Concentración de elementos (mg kg^{-1}) en trasplantes de *F. praesignis* después de cuatro meses de exposición. En los gráficos de dispersión se muestra el efecto de la orientación de los sitios de monitoreo [●]Este, [●]Norte, [●]Oeste, [●]Sur, y de su distancia con respecto a la fuente de contaminación (papelera). Los gráficos de dispersión con rectas que tienen distintas pendientes (As y Zn) indican la interacción significativa entre los factores (Dist:Orient); de no haber interacción se muestran rectas con la misma pendiente. Gráficos con una sola recta (Ni) indican que solo la distancia fue significativa. Las gráficas de barras representan aquellos elementos en los que solo la orientación tuvo un efecto significativo. Las barras con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de trasplantes. Valores de R2: As (0.38), Co (0.34), Cu (0.39), Fe (0.24), Ni (0.09), V (0.19), Zn (0.49).

Tabla 4. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) para probar el efecto de la distancia y la orientación de la industria papelera sobre la concentración de elementos (mg kg^{-1}) en los trasplantes de *U. ceratina* después de cuatro meses de exposición. Los valores en negrita y con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$). (*) Elementos sin distribución normal analizados mediante un MLG, representándose el valor de “Chi cuadrada” (χ^2).

	<i>U. ceratina</i>								
	Distancia (Dist)			Orientación (Orient)			Dist:Orient		
	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
Al	1.58	1,50	0.21	2.33	3,49	0.08	1.38	3,49	0.25
As (*)	15.09	1,50	<0.01*	33.29	3,49	<0.01*	32.30	3,49	<0.01*
Cd (*)	0.28	1,50	0.59	0.87	3,49	0.83	3.37	3,49	0.33
Co	2.88	1,50	0.09	1.20	3,49	0.31	0.76	3,49	0.51
Cr	0.13	1,50	0.71	3.45	3,49	0.02*	1.19	3,49	0.32
Cu	1.29	1,50	0.26	0.79	3,49	0.53	2.39	3,49	0.07
Fe	0.47	1,50	0.49	1.57	3,49	0.20	1.71	3,49	0.17
Mn	0.13	1,50	0.71	0.28	3,49	0.83	2.90	3,49	0.04*
Ni	0.33	1,50	0.56	2.29	3,49	0.08	1.47	3,49	0.23
V	0.25	1,50	0.61	1.29	3,49	0.28	1.67	3,49	0.18
Zn	0.19	1,50	0.66	11.33	3,49	<0.01*	0.71	3,49	0.54

U. ceratina

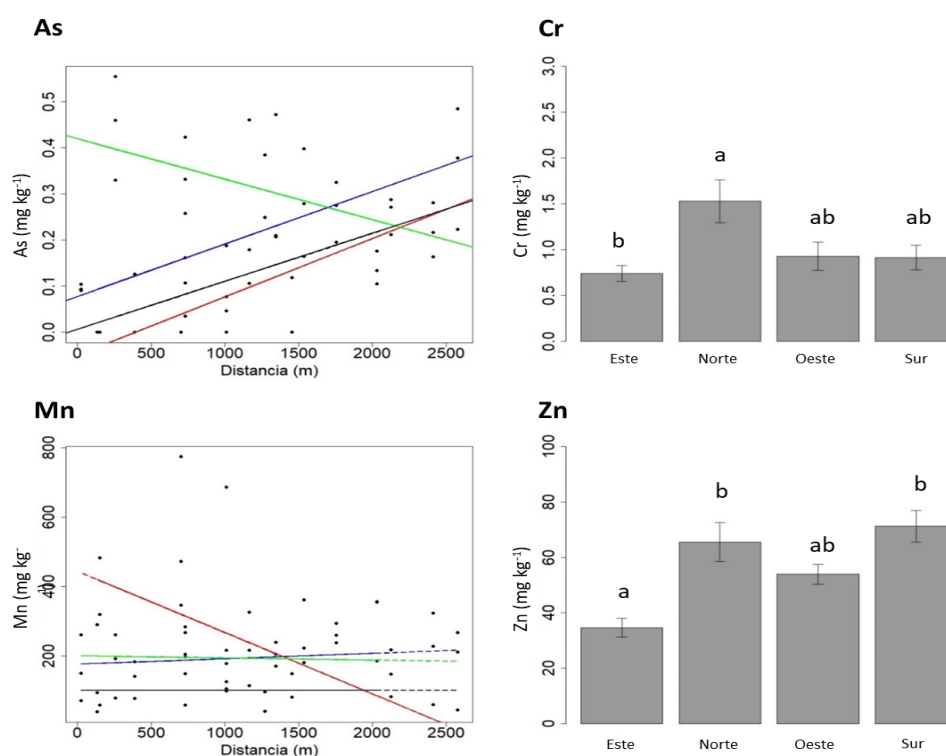


Figura 7. Concentración de elementos (mg kg^{-1}) en trasplantes de *U. ceratina* después de cuatro meses de exposición. En los gráficos de dispersión se muestra el efecto de la orientación de los sitios de monitoreo [●]Este, [●]Norte, [●]Oeste, [●]Sur, y de su distancia con respecto a la fuente

de contaminación (papelera). Los gráficos de dispersión con rectas que tienen pendientes distintas (As y Mn) indican la interacción significativa entre los factores (Dist:Orient); de no haber interacción se muestran rectas con la misma pendiente. Las gráficas de barras representan aquellos elementos en los que solo la orientación tuvo un efecto significativo. Las barras con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de trasplantes. Los valores de R^2 fueron para As (0.64) y Mn (0.16).

3.2. Distribución de elementos en el área de estudio

Los patrones de distribución de los elementos acumulados por *F. praesignis* y *U. ceratina* en el área de estudio son mostrados en las Figuras 8 y 9, respectivamente.

A excepción del Cd, la mayoría de los elementos acumulados por *F. praesignis* mostraron patrones de distribución similares. El Al, As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y Zn presentaron mayores niveles de concentración principalmente en las direcciones oeste y este, y fueron menormente acumulados en el centro y sur del área de estudio (Figura 8). Altos niveles de concentración de As, Cu, V y Zn también se observaron en sitios ubicados al norte. El Cd por su parte, presentó altas concentraciones en las inmediaciones de la industria papelera (Figura 8).

En *U. ceratina*, la mayoría de los elementos presentaron altas concentraciones hacia el este y norte del área de estudio; aunque también se observó una importante zona de acumulación en el sur (Figura 9). En general, se observaron menores niveles de acumulación al centro del área de estudio; sin embargo, elementos como Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Ni y V, fueron acumulados en algunos de los sitios próximos a la papelera (Figura 9).

Considerando los patrones de distribución de todos los elementos acumulados por las dos especies de líquenes se elaboraron mapas de contaminación total (Figura 10 A y C). La mayor carga de elementos para los trasplantes de *F. praesignis* se observó hacia el este, norte y oeste del área de estudio, en los sitios de monitoreo más alejados de la papelera, cercanos a la ciudad de Morelia y algunos otros asentamientos (Figura 10A). Mientras que, en *U. ceratina*, las principales zonas de acumulación se ubicaron hacia el este y norte, en sitios más próximos al área industrial (Figura 10C). En las dos especies, la zona de menor acumulación de elementos se observó hacia sur del área de estudio.

F. praesignis

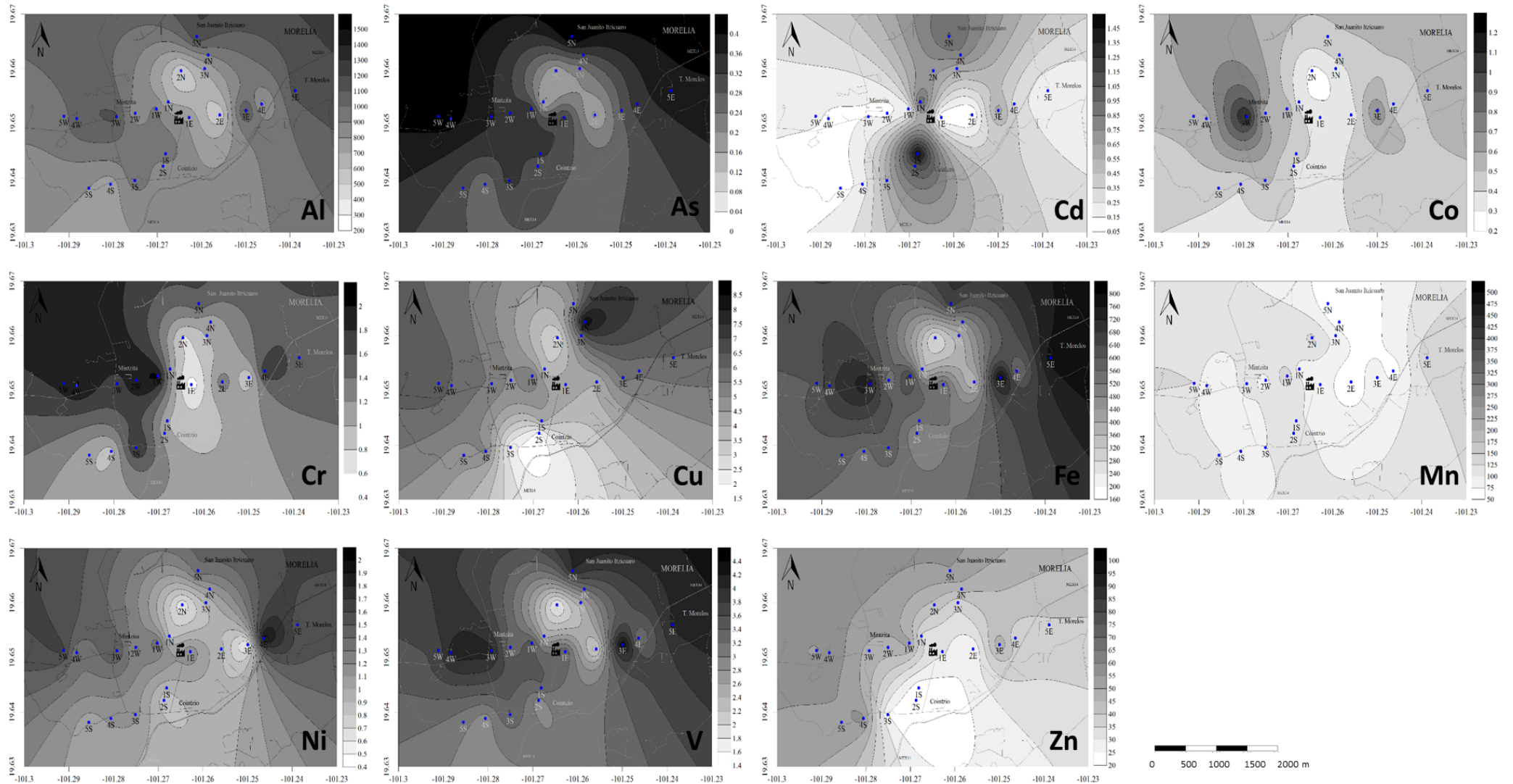


Figura 8. Mapas de isocontaminación de los patrones de distribución de los elementos medidos en los trasplantes de *F. praesignis* alrededor de la industria papelera después de cuatro meses de exposición. La escala muestra la concentración de cada elemento en mg kg⁻¹.

U. ceratina

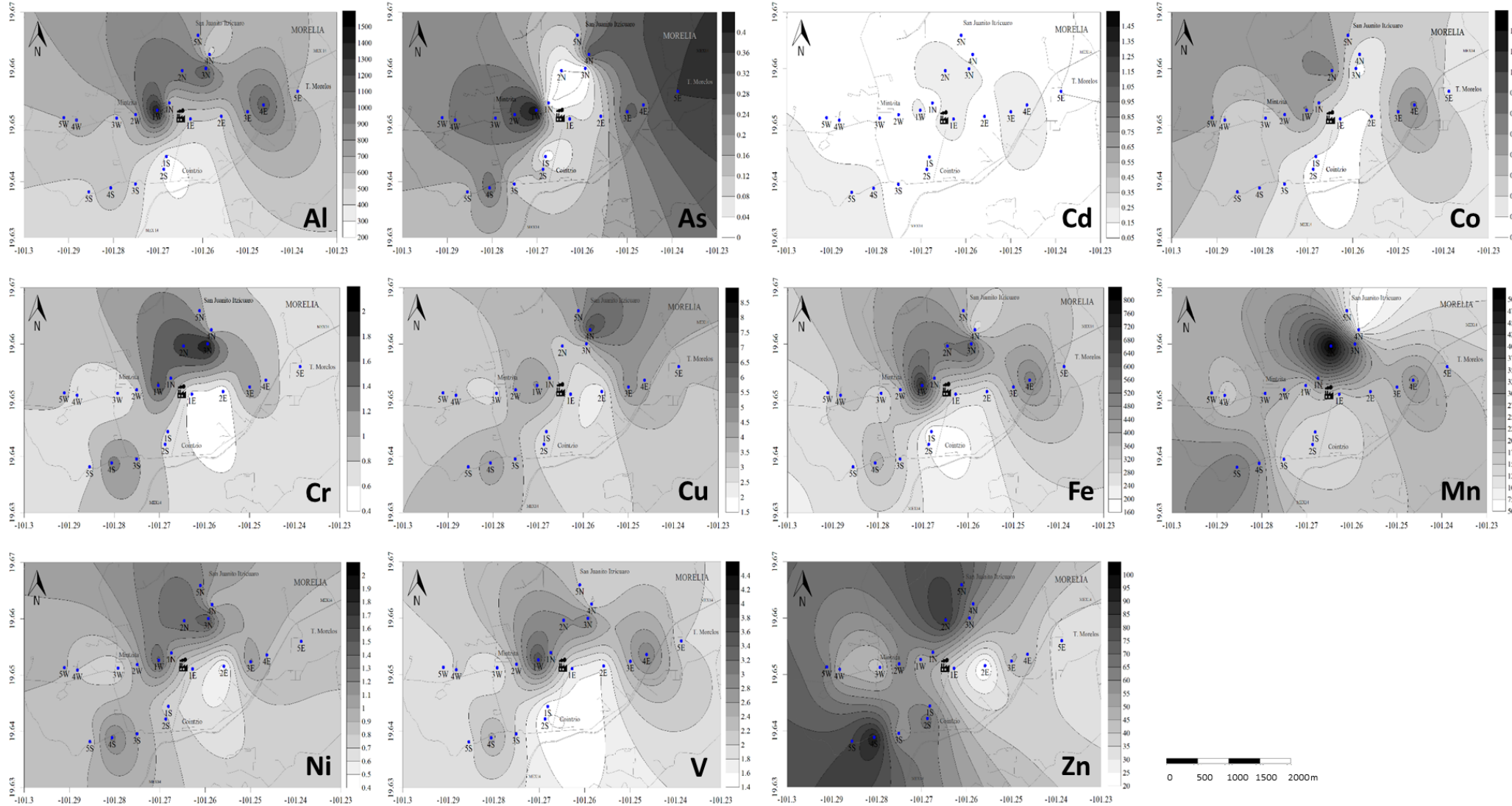


Figura 9. Mapas de isocontaminación de los patrones de distribución de los elementos medidos en los trasplantes de *U. ceratina* alrededor de la industria papelera después de cuatro meses de exposición. La escala muestra la concentración de cada elemento en mg kg⁻¹.

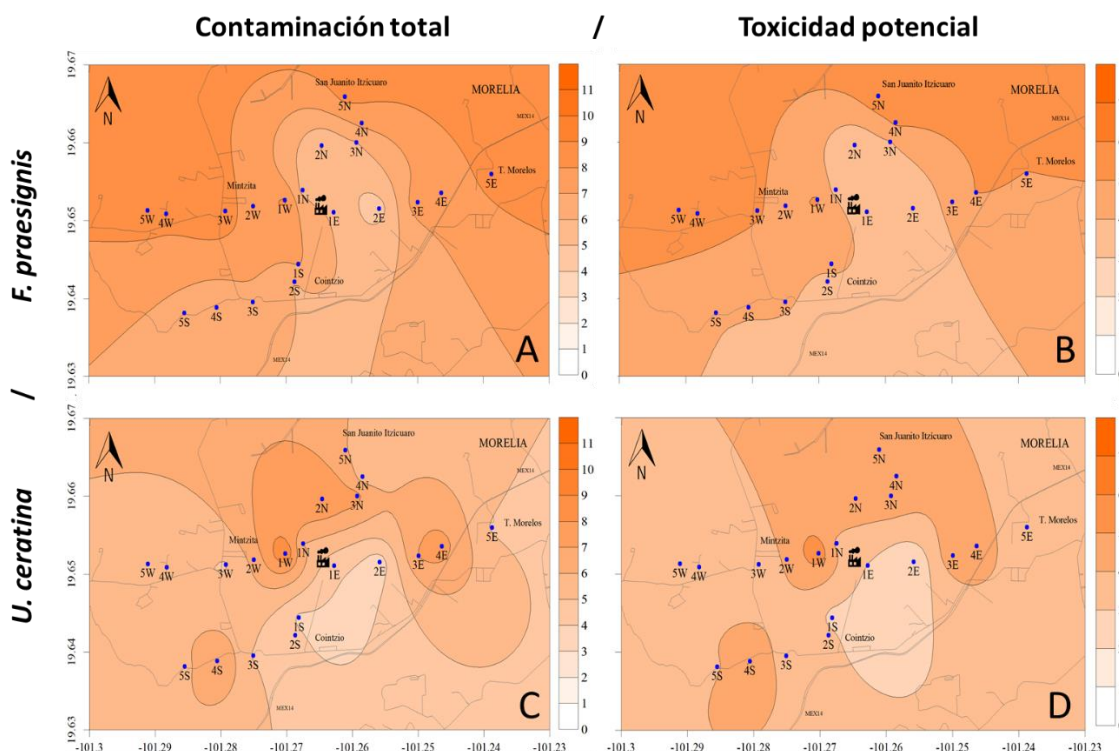


Figura 10. Mapas de contaminación total (izquierda) y de toxicidad potencial (derecha) para el área de estudio. Se muestran los patrones de distribución de los elementos medidos en *F. praesignis* (A y B) y *U. ceratina* (C y D), respectivamente. La escala muestra la cantidad de elementos acumulados (valores de 0 a 11) en el área.

Los elementos con toxicidad potencial (As, Cd, Cr, Cu, Ni y Zn) mostraron patrones de acumulación similares al resto de elementos, esto para ambas especies de líquenes (Figura 10 B y D).

3.3. Relación entre elementos

Los elementos analizados mostraron correlaciones significativas entre sí (Tablas 5 y 6). En ambas especies de líquenes, el Al se correlacionó estrechamente con el Co, Fe y V (coeficientes rho entre 0.60 a 0.90; $p < 0.01$). En *F. praesignis*, el Al se correlacionó fuertemente con el As (0.74, $p < 0.01$), y éste último a su vez con el Cr, Ni y V. El Zn se correlacionó con Cu y Fe (0.56 y 0.49, $p < 0.05$). Las concentraciones de Cd se relacionaron de manera negativa con todos los elementos y, al igual que el Mn no mostraron correlaciones significativas ($p > 0.05$) con otros elementos (Tabla 5).

En *U. ceratina*, el Al presentó una correlación significativa ($p < 0.05$) con el Mn y Ni (Tabla 6). Además, el Ni estuvo estrechamente correlacionado con el Cr, Cu y Zn

(coeficientes entre 0.50 y 0.90). El Cd únicamente se correlacionó con el Mn (0.48, $p<0.05$).

Tabla 5. Análisis de correlación entre elementos en *F. praesignis*. Valores de coeficiente de correlación de Spearman (rho).

	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	V	Zn
Al	1										
As	0.74 **	1									
Cd	0.11	-0.11	1								
Co	0.82 **	0.68 **	-0.16	1							
Cr	0.34	0.61 **	-0.32	0.57 **	1						
Cu	0.34	0.38	-0.18	0.47 *	0.22	1					
Fe	0.87 **	0.71 **	-0.18	0.85 **	0.35	0.39	1				
Mn	0.18	0.10	-0.03	0.28	0.11	0.01	0.27	1			
Ni	0.39	0.82 **	-0.40	0.49 *	0.66 **	0.47 *	0.53 *	0.06	1		
V	0.91 **	0.78 **	-0.12	0.88 **	0.40	0.41	0.92 **	0.15	0.52 *	1	
Zn	0.31	0.32	-0.29	0.47	0.27	0.56 **	0.49 *	0.06	0.39	0.37	1

**Significancia de $p<0.01$ y * $p<0.05$

Tabla 6. Análisis de correlación entre elementos en *U. ceratina*. Valores de coeficiente de correlación de Spearman (rho).

	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	V	Zn
Al	1										
As	0.21	1									
Cd	0.35	-0.10	1								
Co	0.65 **	0.31	0.34	1							
Cr	0.65 **	-0.04	0.37	0.42	1						
Cu	0.31	0.45 *	0.33	0.39	0.52 *	1					
Fe	0.94 **	0.13	0.35	0.59 **	0.76 **	0.37	1				
Mn	0.54 *	-0.15	0.48 *	0.40	0.41	-0.01	0.59 **	1			
Ni	0.70 **	0.08	0.34	0.44 *	0.93 **	0.59 **	0.78 **	0.34	1		
V	0.90 **	0.24	0.34	0.62 **	0.80 **	0.54 *	0.95 **	0.55 *	0.80 **	1	
Zn	0.06	-0.13	0.22	0.12	0.48 *	0.19	0.10	0.23	0.47 *	0.14	1

**Significancia de $p<0.01$ y * $p<0.05$

En la Figura 11 se muestra la clasificación de los elementos en el análisis clúster para las dos especies de líquenes. Con base en las concentraciones de los elementos medidas en los trasplantes de *F. praesignis* se distinguieron 2 clústeres principales: el primero formado solo por el Cd y el segundo por el resto de los elementos. Dentro del clúster 2 los elementos se agruparon en otros dos grupos: I) Al, As, Cr, Fe, Mn y V, y II) Co, Cu y Zn (Figura 11A).

El dendrograma para *U. ceratina* también se dividió en dos clústeres principales, el primero se conformó únicamente al As, mientras que el segundo incluyó a los demás elementos (Figura 11B).

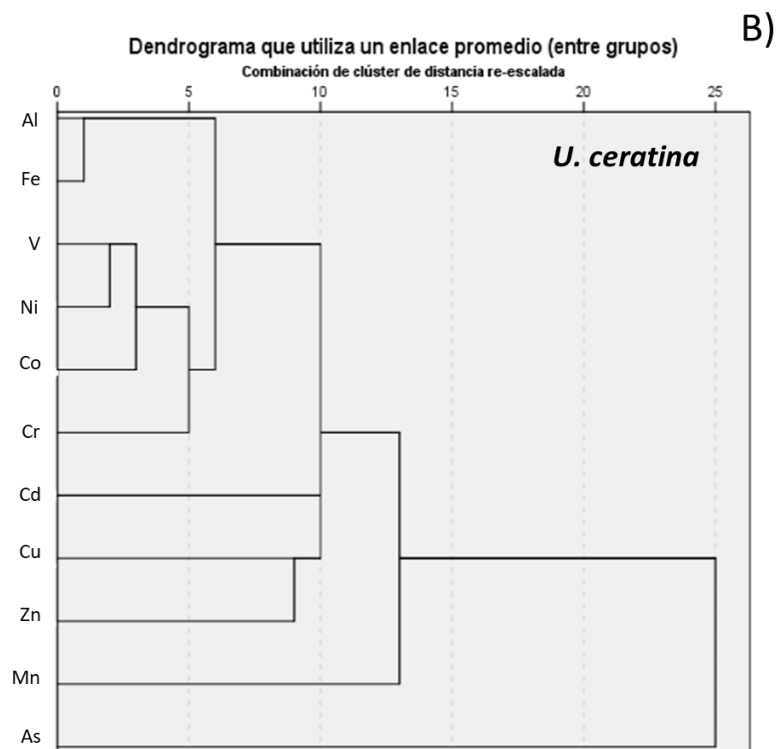
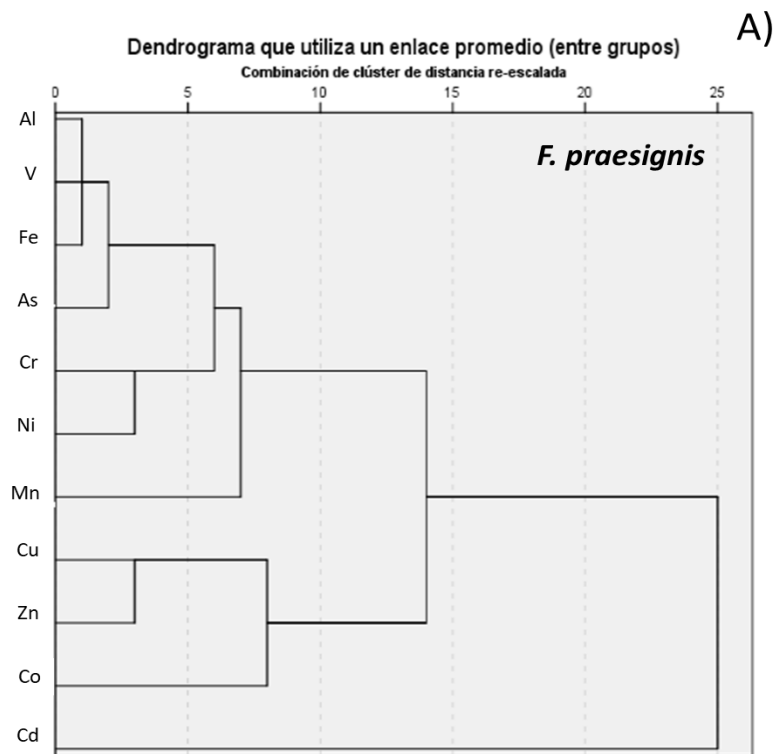


Figura 11. Dendrogramas resultado del análisis clúster jerárquico de los elementos en A) *F. praesignis* y B) *U. ceratina*. Los elementos son agrupados con base en las similitudes en sus patrones de acumulación en el área de estudio. El algoritmo clúster fue ligamiento promedio y para la medida de similitud se calculó de la distancia euclídea.

4. Discusión

4.1. Acumulación en el área de estudio y sitios control

Los resultados del presente estudio indicaron que solo las concentraciones de algunos elementos (Al, As, Cu, Cd y Zn) variaron significativamente entre los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* expuestos alrededor de la industria papelera y los colocados en los sitios control. De esta manera, se observó que los trasplantes en el sitio control mostraron una importante acumulación de Al, As y Zn; mientras que, los ubicados en el área industrial, presentaron un incremento en sus concentraciones de Cd y Cu.

Si bien, el principal criterio para la selección de un sitio control es que debe ubicarse en una zona libre de la influencia de fuentes de contaminación atmosférica, es importante considerar que el aire de dicha zona puede no encontrarse completamente “limpio” (Kularatne y De Freitas, 2013). En nuestro caso, los dos sitios control seleccionados (Área Voluntaria para la Conservación “El Tocuz” e Ichaqueo) corresponden a zonas de bosque poco manejadas, pero cercanas a áreas de cultivo, zonas rurales y caminos transitados ocasionalmente por vehículos. Dichas fuentes de contaminación local pudieran influir sobre la composición elemental de los trasplantes expuestos en los sitios control.

La presencia de elementos como el Al en el talo de líquenes en áreas no contaminadas, generalmente, está relacionada con la acumulación de partículas provenientes del suelo y rocas (Loppi *et al.*, 1999), por lo que, el suelo sería una fuente de contaminación en los sitios control. El As y Zn son elementos que también pueden estar presentes naturalmente en el suelo; sin embargo, comúnmente son emitidos por fuentes antropogénicas como la agricultura y el tráfico vehicular (Nimis *et al.*, 1999; Bajpai *et al.*, 2012).

El periodo de exposición es un factor que puede influir sobre la acumulación de elementos en los líquenes (Bergamaschi *et al.*, 2007; Paoli *et al.*, 2018). Es bien conocido que los líquenes tienden a responder rápido a cambios en los niveles de contaminación ambiental, pudiendo acumular contaminantes en unas pocas semanas o meses al incrementar la contaminación (Bačkor y Loppi, 2009). De esta manera, periodos cortos de exposición (uno a tres meses) son sugeridos (Garty, 2001; Mikhailova, 2002). En este trabajo, los líquenes fueron expuestos durante cuatro meses, periodo que pudo no ser el adecuado para registrar efectos significativos sobre la acumulación de elementos en el talo.

Variaciones en las concentraciones de elementos durante el periodo de exposición han sido reportadas en la literatura (Bargagli y Milaknova, 2002; Backor y Loppi, 2009). Bačkor y Loppi (2009), indican que, aunque si bien el contenido de elementos en el talo tiende a incrementar en función del tiempo, las concentraciones de estos también pueden sufrir disminuciones o incrementos temporales. Estas variaciones pueden estar relacionadas con factores ambientales como la lluvia, la cual tiene un impacto sobre la acumulación y liberación de elementos en el talo (Kularatne y De Freitas, 2013). Por un lado, la lluvia es una fuente rica en elementos para los líquenes (Knops *et al.*, 1991) y, por otro, puede lavar fácilmente los elementos que se han acumulado sobre la superficie del talo, resultando en bajos contenidos de elementos durante la época de lluvias en comparación con la época de secas (Brown y Brown, 1991; Backor y Loppi, 2009).

En el presente estudio, los talos de ambas especies de líquenes fueron recolectados y trasplantados antes del comienzo de la época de lluvias, en el mes de abril del 2018, y recolectados posteriormente para su análisis en el final de la temporada de lluvias, en agosto de 2018 (ver Figura 2B), por lo que la lluvia pudiera haber afectado el contenido de elementos en los trasplantes expuestos en el área de estudio. Sin embargo, las concentraciones de elementos medidas en este trabajo, corresponden a las concentraciones totales de estos durante todo el periodo de exposición, por lo que no fue posible diferenciar patrones estacionales.

Asimismo, la concentración de elementos en los líquenes también puede ser regulada por procesos fisiológicos al interior del talo, que implican la movilización de los elementos y su intercambio con el medio (Godinho *et al.*, 2009). De esta manera, durante sucesivas fases de acumulación y pérdida de elementos, las concentraciones de los contaminantes en el talo alcanzan un equilibrio con los niveles promedio de contaminación ambiental (Kularatne y De Freitas, 2013).

Como se mencionó anteriormente, el Cd y Cu se caracterizaron por presentar mayores niveles de concentración en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* expuestos alrededor de la papelera. Otros elementos como el As, Cr, Co, Fe, Ni y V, mostraron una tendencia a acumularse más en el área industrial que en el sitio control, aunque no de forma significativa.

La acumulación de elementos en el área de estudio posiblemente tenga su origen en la industria papelera, la cual es conocida por ser una fuente importante de partículas que

comúnmente llevan consigo metales y algunos otros elementos, entre ellos: Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, Sb, V, Ti y Zn (EPA, 2002; Nurmesniemi *et al.*, 2008; Cheremisinoff y Rosenfeld, 2010). Dentro de las fábricas de papel y celulosa Kraft existen diferentes fuentes que pueden emitir partículas junto con trazas de elementos a la atmósfera como son los hornos de recuperación, hornos de cal, el tanque de disolución y fundido (Bordado y Gomes, 1997; Cheremisinoff y Rosenfeld, 2010).

Los elementos acumulados por ambas especies de líquenes en el área de estudio coinciden con los encontrados en otros estudios de biomonitorio cerca de industrias papeleras (Halonen *et al.*, 1993; Kytömaa *et al.*, 1995; Adoli *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2012). Una comparación de las concentraciones de los 11 elementos encontradas alrededor de la papelera y los resultados obtenidos en estudios similares se recopila en el Cuadro 7.

Considerando las concentraciones promedio de los elementos analizados en este trabajo, pudimos observar que la mayoría de ellas fueron más bajas que las reportadas para otros estudios (Halonen *et al.*, 1993; Kytömaa *et al.*, 1995); sin embargo, los rangos de concentraciones encontradas en el área de estudio muestran mayor similitud (Cuadro 7). Las diferencias observadas pudieran estar relacionadas con la metodología empleada entre trabajos. Halonen *et al.* (1993) analizaron la acumulación de elementos en líquenes nativos de la especie *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. en los alrededores de una industria papelerera en Finlandia, durante un periodo de 15 años. Kytömaa *et al.* (1995), evaluaron el efecto de las emisiones de una planta de celulosa y papel al sulfito sobre talos de *H. physodes* que crecían en sus inmediaciones.

Como se muestra los niveles de concentración medidos fueron más altos que los observados por Azevedo *et al.* (2012) en trasplantes de *Flavoparmelia caperata* (Nyl.) Hale expuestos seis meses en los alrededores de una industria papelerera Kraft en Portugal (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de resultados de este trabajo con estudios similares en la literatura

Sitio de estudio	Período	Especie (origen)	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	V	Zn	
Planta de celulosa y papel (Kraft) Morelia, México (Este estudio)	4 meses	<i>U. ceratina</i> (trasplantes)	\bar{X}	0.18	0.14	0.46	0.99	3.66	363.18	216.26	0.98	2.24	56.01	
			rango	98.37-2284.20	0.03-0.55	0.07-1.18	0.22-2.61	0.99-8.30	76.14-1059.43	38.92-773.85	0.21-2.15	0.78-5.29	9.23-118.79	
		<i>F. praesignis</i> (trasplantes)	\bar{X}	0.31	0.27	0.50	1.27	4.86	558.36	95.94	1.13	3.26	40.96	
			rango	350.05-2241.71	0.03-0.52	0.21-2.44	0.08-2.64	0.11-12.8	195.87-1590.84	42.23-223.22	0.07-3.43	1.29-8.22	3.37-78.28	
Planta de celulosa y papel (Kraft) Figueira da Foz, Portugal (Azevedo <i>et al.</i> .2012)	6 meses	<i>F. caperata</i> (trasplantes)	\bar{X}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			rango	600.0-1100.0	-	0.15-0.27	0.09-0.21	1.1-3.2	3.7-4.8	220.0-480.0	10.0-47.0	0.8-1.8	2.5-3.5	40.0-55.0
Planta de celulosa y papel (al sulfito) Mäntä, Finlandia (Kytöma <i>et al.</i> .1995)	-	<i>H. physodes</i> (nativos)	\bar{X}	1202	0.33	-	-	-	2452	-	-	-	-	118
			rango	421.0-2296.0	-	0.07-0.80	-	-	-	769.0-6060.0	-	-	-	-
Planta de celulosa y papel (Kraft) Finlandia (Halonen <i>et al.</i> .1993)	15 años	<i>H. physodes</i> (nativos)	\bar{X}	550	0.52	-	1.74	5.93	643.33	58.03	1.35	-	77.89	
			rango	420.0-1020.0	-	0.02-2.23	-	0.7-5.3	3.5-12.7	380.0-1540.0	28.3-125.3	0.0-5.5	-	58.7-196.6

4.2. Variación entre especies

Es reconocido que la capacidad de los líquenes para atrapar partículas puede ser fuertemente influenciada por las características morfológicas y estructurales del talo (Lawrey y Hale, 1981; Nimis *et al.*, 2001; Bargagli y Mikhailova, 2002; Di Lella *et al.*, 2003; Bergamaschi *et al.*, 2007); así como por su ecofisiología (Bosserman y Hagner, 1981). Las especies pertenecientes al género *Usnea*, se caracterizan por ser líquenes fruticosos o con forma de “arbusto”, cuyo talo consiste en numerosos, alargados y finos cilindros que cuelgan y se encuentran unidos al sustrato por un solo punto de fijación. De esta manera, dichas especies presentan una gran superficie expuesta al aire y se ven influenciadas fuertemente por factores atmosféricos (Bosserman y Hagner, 1981). En contraste, los líquenes foliosos como *Flavopunctelia*, se caracterizan por tener un talo más aplanado formado por lóbulos anchos que encuentran adheridos al sustrato por diferentes puntos de fijación, por lo que cuentan con una menor superficie por unidad de biomasa en contacto con el medio en comparación con *Usnea* (Bosserman y Hagner, 1981; Di Lella *et al.*, 2003).

Otros estudios han reconocido que los líquenes foliosos tienen una mayor capacidad para acumular metales sobre los líquenes fruticosos. Lawrey y Hale (1981) determinaron un mayor contenido de Pb en los líquenes foliosos *Pseudoparmelia baltimorensis* (Gyeln. y Fóriss) Hale y *Xanthoria conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale en comparación con *Cladonia subtenuis* (Abbayes) Mattick que tiene un talo secundario fruticoso. Altas concentraciones de Pb, Cu y Zn fueron encontradas por Gleen *et al.* (1995) en especies foliosas como *Parmelia sulcata* Tayl. y *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog en comparación con *Anaptychia ciliaris* (L.) Körb. ex A. Massal. Mientras que, Garty *et al.* (1996), observó que *H. physodes* contenía más Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni y Zn que el líquen fruticoso *U. hirta*, ambos trasplantados y expuestos en sitios urbanos de Oulu, Finlandia.

En nuestro caso, los resultados indican que *F. praesignis* mostró una mayor habilidad para acumular elementos que *U. ceratina*. Estas diferencias posiblemente se deban a otros factores diferentes a su morfología. De acuerdo con Paoli *et al.* (2018), la acumulación de elementos en los líquenes puede también variar dependiendo de la edad, el estado fisiológico del talo, el periodo de exposición, las condiciones microclimáticas, y de manera muy importante, de la concentración y el tipo de contaminantes presentes en el ambiente.

Otros autores como Godinho *et al.* (2009) señalan que, el biomonitoreo con líquenes depende fuertemente de las especies utilizadas, ya que estas pueden tener diferentes mecanismos de acumulación al interior del talo y presentar una afinidad por acumular distintos elementos. Asimismo, Bergamaschi *et al.* (2007) argumenta que, la selección de una especie como biomonitor debe ser basada en sus características para acumular elementos y los propósitos del trabajo.

Como vimos en el capítulo I, *U. ceratina* mostró ser una especie más sensible a la contaminación del aire. Después de cuatro meses de exposición en el área de estudio, los trasplantes de esta especie mostraron disminuciones en su contenido de clorofila total y presentaron mayores síntomas de daños sobre el talo en comparación con los trasplantes de *F. praesignis*. De esta manera, *U. ceratina* se vio menos favorecida para acumular elementos que *F. praesignis* durante el periodo de exposición.

4.3. Patrones de distribución de los elementos

De acuerdo con nuestros resultados, los patrones de distribución de algunos de los elementos mostraron una estrecha relación con la distancia de la fuente de contaminación. Aunque con algunas variaciones, las concentraciones de elementos como As, Co, Cu, Fe, Ni, V y Zn fueron significativamente más altas en los trasplantes de *F. praesignis* expuestos a 1500 m de la industria papelera en casi todas las direcciones.

Por el contrario, en *U. ceratina* se observó que la mayoría de los elementos fueron acumulados en sitios más próximos a la papelera, entre los 500 y 1000 m, principalmente en los trasplantes expuestos en la dirección norte. Asimismo, las concentraciones de los elementos acumulados en los trasplantes de esta especie tendieron a disminuir conforme incrementaba la distancia. Lo anterior indicaría que la industria papelera es una de las principales fuentes de elementos en el área de estudio.

Comúnmente se observa que los contaminantes suelen presentar mayores niveles de concentración cerca de las fuentes de emisión y que éstos tienden a disminuir a medida que la distancia a la fuente incrementa; sin embargo, este patrón puede ser afectado por factores como la topografía y los vientos dominantes (Richardson, 1992). En nuestro caso, la mayor parte del área de estudio corresponde a llanuras, aunque también se presentan algunas elevaciones en el relieve hacia el oeste y sur del área industrial (ver Figura 1), las cuales pudieran influir sobre los patrones de acumulación de los elementos,

al limitar o favorecer el contacto de los trasplantes de ambas especies de líquenes con las masas de aire cargadas de contaminantes. Otro factor a considerar pudiera ser la altura a la que son emitidos con los contaminantes desde la fuente de contaminación, la cual afectaría sobre su punto de caída dentro del área de estudio (Newberry, 1974).

Garty (2001) señala que una significativa disminución de la contaminación con la distancia también puede estar relacionada con la naturaleza de los elementos acumulados en el talo, observándose que, las partículas más gruesas tienden a presentar una limitada dispersión en comparación con partículas más pequeñas. Este patrón fue encontrado por Bajpai y col (2010), quienes determinaron que el Al, Fe y Cr, asociados a la emisión de partículas más gruesas, mostraban una menor dispersión que elementos como el Cu y Ni unidos a fracciones de cenizas más pequeñas y volátiles. En el presente trabajo, el Al, As, Cd, Cr, Fe y V se caracterizaron por presentar mayores concentraciones cerca de la industria papelera, en sitios ubicados entre los 1000 y 1500 m; mientras que, elementos como el Co, Cu, Mn, Ni y Zn tendieron a mostrar una mayor dispersión.

Entre los factores ambientales, el viento juega un papel muy importante en los patrones de distribución de los contaminantes, debido a que las direcciones en las cuales éstos son transportados por el viento son fundamentales para determinar sus principales puntos de caída (Conti, 2008). En el área de estudio, la mayor parte del año los vientos dominantes soplan desde el sureste y sur-sureste (ver Figura 2C), por lo que las direcciones noroeste y norte-noroeste representaron las principales zonas de dispersión de los contaminantes.

Además de la papelera, nuestros resultados indican que en el área de estudio también existen otras fuentes de elementos. Como se muestra en los mapas de isocontaminación, importantes zonas de acumulación se observaron en los sitios de monitoreo ubicados de las direcciones este, norte y oeste, los cuales se encuentran cercanos a zonas transitadas por vehículos, así como a áreas urbanas de la ciudad de Morelia. Asimismo, alrededor de la industria papelera se pueden observar varias áreas de cultivo y otras pequeñas industrias como un aserradero al oeste y una cementera al sur (ver Figura 1).

La información obtenida de los mapas de contaminación total corrobora la idea anterior. Al considerar los datos de concentración de todos los elementos en los trasplantes de ambas especies de líquenes, se observó que los elementos acumulados por ambas especies de líquenes se depositan mayormente en las direcciones este, norte y oeste, y en menor medida hacia el sur.

La similitud entre los mapas de contaminación total y de toxicidad potencial indica que los elementos con cierto nivel de toxicidad como As, Cd, Cr, Cu, Ni, V y Zn también están presentes en los sitios con mayor acumulación, donde pudieran generar un riesgo para la salud. El As, Cd y Cr son metales pesados conocidos por ser tóxicos a bajas concentraciones y pueden ocasionar daños cardiovasculares, nerviosos, gastrointestinales, respiratorios e incluso genéticos (Tchounwou *et al.*, 2012).

4.4. Relación entre elementos y fuentes de origen

Estrechas correlaciones entre elementos generalmente sugieren que estos comparten una fuente de origen en común, o bien, que han sido expuestos a las mismas condiciones atmosféricas (Boskurt, 2017). Los resultados de los análisis de correlación y los análisis clúster, nos indicaron que algunos de los elementos medidos en el área estudio tuvieron características o comportamientos similares por lo que pudieran provenir de una misma fuente de origen.

- *Al, Fe y V*

El Al, Fe y V, fueron elementos que se caracterizaron por presentar patrones de distribución similares y encontrarse significativamente correlacionados entre sí. Lo anterior coincide con lo observado por Nimis y col (1999), quienes determinaron que la relación entre estos elementos era debida a que una de sus principales fuentes de origen es el suelo. El Al junto con el Fe son elementos litogénicos que abundan en la corteza terrestre, por lo que comúnmente son usados para indicar la contaminación proveniente de partículas del suelo y rocas (Loppi *et al.*, 1999). Altas concentraciones de Al, Fe y V se observaron en las inmediaciones de la industria papelera. Estos elementos provendrían del levantamiento de partículas durante las actividades agrícolas y el tránsito de vehículos.

Kytömaa *et al.* (1995), registraron altos niveles de Al cerca de una industria papelera en Finlandia, los cuales se relacionaron con la emisión de materia particulada durante la quema de residuos dentro de la fábrica.

En el área de estudio, el Fe y V también podrían ser emitidos durante la quema combustibles fósiles y por el escape de automóviles (Nimis *et al.*, 1999; Bozkurt, 2017).

- *Cr y Ni*

Una estrecha relación entre el Cr y Ni se ha reportado en la literatura (Nimis *et al.*, 1999; Loppi y Pirintsos, 2003; Brunialti y Frati, 2007; Bozkurt, 2017). Ambos elementos son

comúnmente emitidos por la quema de combustibles fósiles y el tráfico vehicular (Bozkurt, 2017). En particular, el Cr ha sido reportado también como un desecho de la industria del papel, cromado y pinturas (Brunialti y Frati, 2007). En el área de estudio estos dos elementos presentaron altos niveles de concentración en los trasplantes expuestos cerca de la industria papelera y el área urbana.

- *Co*

En ambas especies de líquenes, el Co mostró una correlación significativa con elementos litogénicos como el Al y Fe, y de origen antropogénico como el Cr y Ni. La razón de ello pudiera ser que, entre las principales fuentes de Co se encuentra el uso de fertilizantes fosfatados, la quema de combustibles fósiles y la combustión del aceite (Kim *et al.*, 2006). En el área de estudio, la presencia de Co se asociaría a las actividades agrícolas y a la quema de aceite por parte de los vehículos que transitan por caminos y la carretera Pátzcuaro-Morelia (MEX14).

- *As*

El As presentó fuertes correlaciones con el Al, Cr, Co, Fe, Ni y V en *F. praesignis*, mientras que en *U. ceratina*, este elemento solo se relacionó con el Cu. Altas concentraciones de As fueron encontradas al oeste del área industrial y en los sitios de monitoreo ubicados en las direcciones este y norte, cerca de la zona urbana. La presencia de As en el área de estudio pudiera deberse al uso de fertilizantes, herbicidas, plaguicidas e insecticidas en las zonas de cultivo, ya que este elemento es comúnmente utilizado en la elaboración de estos productos (Tchounwou *et al.*, 2012). Otra fuente antropogénica de As estaría asociada al tráfico vehicular (Nimis *et al.*, 1999).

- *Cd*

Entre los elementos analizados, el Cd destacó por presentar altos niveles de concentración en los trasplantes expuestos a menos de 500 m de la papelera, por lo que esta industria sería una de sus principales fuentes de origen en el área de estudio. Estudios similares han reportado la acumulación de Cd cerca de industrias papeleras (Halonen *et al.*, 1993; Kytömaa *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2012). El Cd también suele ser un subproducto del uso de fertilizantes y pesticidas (Nimis *et al.*, 1999; Bozkurt, 2017).

- *Mn*

En los trasplantes de *F. praesignis*, el Mn mostró bajos niveles de concentración y una nula relación con el resto de los elementos. Caso contrario se observó en los trasplantes

de *U. ceratina*, donde este elemento presentó mayores concentraciones y se correlacionó significativamente con el Al, Fe y Cd.

Al igual que el Al y Fe, el Mn es un elemento que puede estar presente el suelo (Nimis *et al.*, 1999; Bozkurt, 2017); sin embargo, su relación con el Cd nos indicaría el origen antropogénico de este elemento. Trabajos previos de contaminación por metales en suelos urbanos de Morelia, han determinado altos niveles de Mn (3640 mg kg^{-1}) en el suelo del área de estudio producto del uso de plaguicidas (Delgado *et al.*, 2015, 2018).

- *Cu y Zn*

El Cu y Zn fueron elementos cuya concentración incremento significativamente con la distancia desde la fuente de contaminación. Estos dos elementos se caracterizaron por presentar mayores niveles de acumulación en trasplantes expuestos más lejos de la papelera (entre 2000-2500 m) principalmente en las direcciones norte y sur, donde se ubican áreas de cultivo, áreas urbanas y otras pequeñas industrias (cementera). Entre las fuentes antropogénicas de Cu y Zn se incluyen la quema de combustibles fósiles, el tráfico vehicular, el uso de pesticidas y fertilizantes (Nimis *et al.*, 1999; Brunialti y Frati, 2007).

Una fuerte correlación entre el Zn y Cu ha sido reportada en la literatura (Loppi *et al.*, 1999; Loppi y Pirintsos, 2003; Brunialti y Frati, 2007) y es considerada común en líquenes, en los que suelen acumularse intracelularmente y cumplir ciertas funciones metabólicas (Godinho *et al.*, 2009).

5. Conclusiones

En este trabajo se evaluó la bioacumulación de elementos en dos especies de líquenes epifitos (*Flavopunctelia praesignis* y *Usnea ceratina*), trasplantados en los alrededores de una industria papelera. Los resultados indican que si bien existen otras fuentes de contaminación en el área de estudio (como zonas de cultivo, el área urbana, tráfico vehicular y otras industrias), la papelera es probablemente una de las principales fuentes de origen de la mayoría de los elementos estudiados. Asimismo, variables como la distancia, la orientación, y factores ambientales como la topografía y los vientos dominantes, tienen un efecto importante sobre los patrones de distribución de los elementos.

Las diferencias mostradas entre *F. praesignis* y *U. ceratina* nos indican que la capacidad de los líquenes para atrapar y acumular partículas desde el aire puede variar en relación a la especie y, que esto a su vez depende de las características morfológicas y ecofisiológicas del talo.

6. Agradecimientos

Los autores expresan un especial agradecimiento a la M. C. Elizabeth Hernández Álvarez y al Laboratorio ICP-MS del Instituto de Geofísica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su apoyo para el análisis de elementos. Se agradece también a CONACyT por la beca otorgada para la realización del proyecto.

7. Referencias

- Adoli, K F. L., Lalah, J. O., Okoth, A. O. 2011. Analysis of Moss and Topsoil to Monitor Metal Emissions from a Pulp and Paper Mill in Western Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86:137-143.
- Azevedo, R. S., Fernández-Salegui A. B., Terrón-Alfonso, A., Soares, A. M. V. M. 2012. Biomonitoring atmospheric pollution from pulp mill industry using lichen transplants in central-littoral Portugal. En: Azevedo, R. S. Lichen biodiversity and biomonitoring of atmospheric pollution. Tesis de grado. Universidad de Aveiro. Departamento de Biología. España.
- Bačkor, M. y S. Loppi. 2009. Interactions of lichens with heavy metals. *Biol. Plantarum.* 53(2): 214-222.
- Bajpai, R., Upreti, D. K. 2012. Accumulation and toxic effect of arsenic and other heavy metals in a contaminated area of West Bengal, India, in the lichen *Pyxine cocolos* (Sw.) Nyl. *Ecotox. Environ. Safe.* 83: 63-70.
- Bajpai, R., Upreti, D. K., Nayaka, S., Kumari, B. 2010. Biodiversity, bioaccumulation and physiological changes in lichens growing in the vicinity of coal-based thermal power plant of Raebareli district, north India. *J. Hazard. Mater.* 174: 429-436.
- Bargagli, R., Mikhailova, I., 2002. Accumulation of inorganic contaminants. En: Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P.A. (eds.), *Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 65-84.
- Bargagli, R., Nimis, P. L. 2002. Guidelines for the use of epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric deposition of trace elements. En: Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley,

- P.A. (eds.), *Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 295-299.
- Bergamaschi, L., E. Rizzio, G. Giaveri, S. Loppi, M. Gallorini. 2007. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. *Environ. Pollut.* 148: 468-476.
- Bordado, J. C. M., Gomes, J. F. P. 1997. Pollutant atmospheric emissions from Portuguese Kraft pulp mills. *Sci. Total Environ.* 208: 139-143.
- Bosserman, R. W., Hagner, J. E. 1981. Elemental composition of epiphytic lichens from Okefenokee Swamp. *The Bryologist*, 84: 48-58.
- Bozkurt, Z. 2017. Determination of airborne trace elements in an urban area using lichens as biomonitor. *Environ. Monit. Assess.* 189: 573.
- Brown, D. H., Brown, R. M., 1991. Mineral cycling and lichens: the physiological basis. *The Lichenologist*, 23: 293-307.
- Brunialti, G., L. Frati. 2007. Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: A retrospective study over a 7-year time span. *Sci. Total Environ.* 387: 289-300.
- Cervantes, L. Avila, O., Ruvalcaba, J. L., Miranda, J., Muñoz, R. 2008. The use of biomonitors and PIXE analysis in the study of air pollution in Mexico City. *X-Ray Spectrom.* 37: 156-162.
- Cheremisinoff, N. P., Rosenfeld, P. E. 2010. Sources of air emissions from pulp and paper mills. En: Cheremisinoff, N. P. y Rosenfeld, P. E. *Best Practices in the Wood and Paper Industries*. Elsevier. pp. 79-259.
- Conti, M. E. 2008. Bioindicators and biomarkers for environmental quality and human exposure assessment: The sustainable world. Vol. 17, WIT. Southampton.
- Conti, M. E., Cecchetti, G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment: a review. *Environ. Pollut.* 114: 471-492.
- Conti, M. E., Pino, A., Botrè, F., Bocca, B., Alimonti, A. 2009. Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). *Ecotox. Environ. Safe.* 72(4): 1082-1089.
- Delgado, C., Israde, I., Bautista, F., Gogichaishvili, A., Márquez, C., Cejudo, R., Morales, J., González, I. 2015. Metales pesados en suelos urbanos de Morelia, Michoacán: influencia del uso del suelo y del tipo de vialidad. *Ciencia Nicolaita.* (65): 120-138.
- Delgado, C., Israde, I., Bautista, F., Gogichaishvili, A., Márquez, C., Cejudo, R., Morales, J., González, I. 2018. Distribución espacial de Fe Li, Pb, Mn, V, y Zn en suelos urbanos de Morelia, Michoacán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 34(3): 427-440.
- EPA. 2002. Profile of the pulp and paper industry. 2nd ed. Sector Notebook Project.

- Garty, J. 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit. Rev. Plant. Sc.* 20: 309-371.
- Garty, J., Kauppi, M., Kauppi, A., 1996. Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites. *J. Environ. Qual.* 25: 265-272.
- Gasparo, D., Castello, M., Bargagli, R. 1989. Biomonitoraggio del' inquinamento atmosferico tramite lichen: Studio Presso un inceneritore (Macerata). *Studio Geobotanica*, 9: 152-250.
- Glenn, M. G., Gomez-Bolea, A., Lobello, R. 1995. Metal content and community structure of cryptogam bioindicators in relation to vehicular traffic in Montseny Biosphere Reserve (Catalonia, Spain). *Lichenologist*, 27: 291-304.
- Godinho, R. M., Verbug, T. G. Freitas, M. C., Wolterbeek, H. Th. 2009. Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of two species of epiphytic lichens transplanted to a polluted site in Portugal. *Environ. Pollut.* 157: 102-109.
- Gómez-Peralta, M., Chávez-Carmona A. 1995. Líquenes indicadores biológicos en el campo geotérmico Los Azufres, Michoacán, México. *Geotermia Revista Mexicana de Geoenergía*, 3: 137-143.
- Gregorio-Cipriano, M. A., Gómez-Peralta, M., Álvarez, I. 2016. Líquenes cortícolas de las áreas urbanas y suburbanas de Morelia, Michoacán, México. *Bot. complut.* 40: 9-21.
- Halonen P., Hyvärinen, M., Kauppi, M. 1993. Emission related and repeated monitoring of element concentrations in the epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* in a coastal area, W Finland, *Ann. Bot. Fenn.* 30(4): 251-261.
- Herrera-Campos, M, Pérez-Pérez, R. E., Nash III, T. H .2016. Lichens of Mexico. The Parmeliaceae: Keys, distribution and specimen descriptions. *Bibliotheca Lichenologica*, 110, J. Cramer, DE.
- INEGI. 2013. Continuo de Elevaciones Mexicano (Nacional) resolución 15 m.
- INEGI. 2017. Conjunto de datos vectoriales de uso del suelo y vegetación escala 1:250 000, serie VI (Conjunto Nacional).
- Knops, J.M.H., Nash, T.H., Boucher, V.L., Schlesinger, W.L., 1991. Mineral cycling and epiphytic lichens: implications at the ecosystem level. *The Lichenologist*, 23: 309-321.
- Kularatne, K. I. A., De Freitas, C. R. 2013. Epiphytic lichens as biomonitors of airborne heavy metal pollution. *Environ. Exp. Bot.* 88: 24-32.
- Kytömaa A., Nieminen, S., Thuneberg, P., Haapala, H., Nuorteva, P. 1995. Accumulation of aluminum in *Hypogymnia physodes* in the surroundings of a Finnish sulphite-cellulose factory. *Water. Air. Soil Pollut.* 81(3): 401-409.
- Lawrey, J. D., Hale, M. E. 1981. Retrospective Study of Lichen Lead Accumulation in the Northeastern United States. *The Bryologist*, 84(4): 449-456.

- Loppi, S., Pirintsos, S. A. 2003. Epiphytic lichens as sentinels for heavy metal pollution at forest ecosystems (central Italy). *Environ. Pollut.* 121: 327-332.
- Loppi, S., Pirintsos, S. A., Dominicis, V. 1999. Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, central Italy). *Environ. Monit. Assess.* 58: 121-131.
- Mikhailova, I. 2002. Transplanted lichens for bioaccumulation studies. En: Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P.A. (eds.). *Monitoring with Lichens—Monitoring Lichens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 301-304.
- Nash, T. H. 1996. Introduction. En: Nash III, T. H. (ed.). *Lichen biology*. Cambridge University Press, Nueva York, EUA. pp. 1-8.
- Nash III, T. H., Ryan, B. D., Gries, C., Bungarts, F. 2002. *Lichen flora of The Greater Sonoran Desert Region Vol. 1*. Arizona State University, Tempe, Arizona, EUA.
- Newberry, G. 1974. The Influence of a sulfate-process paper mill on corticolous lichens. *The Bryologist*, 77(4): 561-576.
- Nieboer, E., Richardson, D. H. S., Tomassini, F. D., 1978. Mineral uptake and release by lichens: an overview. *The Bryologist*, 81(2): 226-246.
- Nimis, P. l., Skert, N., Castello, M. 1999. Biomonitoraggio di metalli in Traccia tramite lichen in aree a rischio del Friuli-Venezia Giulia. *Studia Geobotanica*, 18: 3-49.
- Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A. (eds.). 2002. *Monitoring with Lichens—Monitoring lichens*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Nurmesniemi, H., Pökiö, Kuokkanen, T., Rämö, J. 2008. Chemical sequential extraction of heavy metals and sulphur in bottom ash and in fly ash from a pulp and paper mill complex. *Waste. Manag. Res.* 26: 389-399.
- Kim, J. H., Gibb, H. J., Howe, P. D. 2006. Cobalt and inorganic cobalt compounds. Organización Mundial de la Salud, Concise International chemical assessment document. 69.
- Organismo Operador de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento de Morelia (OOAPAS). 2019. Datos estaciones metrológicas de Morelia: Mintzita periodo 2006-2019.
- Paoli, L., Pisani, T., Guttová, A., Sardella, G., Loppi, S. 2011. Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: Relationship with the lichen diversity. *Ecotox. Environ. Safe.* 74(4): 650-657.
- Paoli, L. Munzi, S., Guttová, A., Senko, D., Sardella, G., Loppi, S. 2015. Lichens as suitable indicators of the biological effects of atmospheric pollutants around a municipal solid waste incinerator (S Italy). *Ecol. Indic.* 52: 362-370.

- Paoli, L., Vanninia, A., Fačkovcováb, Z., Guarnieria, M., Bačkorc, M., Loppi, S. 2018. One year of transplant: Is it enough for lichens to reflect the new atmospheric conditions? *Ecol. Indic.* 88: 495-502.
- Pirintsos, S. A. Loppi, S. 2008. Biomonitoring atmospheric pollution: The challenge of times in environmental policy on air quality. *Environ. Pollut.* 151: 269-271.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Richardson, D. H. S. 1992. Pollution monitoring with lichens. Naturalists Handbooks 19. The Richmond Publishing Co. Ltd. Gran Bretaña.
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). 2011. Temperatura media anual y precipitación anual (1902-2011). Atlas Climático Digital de México.
- Secretaria de Urbanismo y Medio Ambiente del Gobierno del Estado de Michoacán (SUMA). 2015. Programa de Gestión para Mejorar la Calidad del Aire en el Estado de Michoacán 2015 – 2024. SEMARNAT, México. 140 p.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp. Suppl.* 101:133-164.
- US-EPA. 2017. Initial List of Hazardous Air Pollutants with Modifications. Disponible en: <https://www.epa.gov/haps/initial-list-hazardous-air-pollutants-modifications#mods>
- Wolterbeek, H. T., Garty, J., Reis, M. A. y Freitas, M. C. 2003. Capítulo II: Biomonitor in use: Lichens and the metal pollution. Markert, En: B. A., Breure, A. M., Zechmeiste, H. G. (editores). Bioindicators and biomonitors. *Elsevier.* pp. 377-419.
- Zambrano, G.A., Nash III, T.H. 2000. Lichens responses to short-term transplantation in Desierto de los Leones, Mexico City. *Environ. Pollut.* 107: 407-412.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Aunque los líquenes pueden responder a cambios en los niveles de contaminación ambiental, se ha reconocido que no todas las especies son igualmente sensibles a los mismos contaminantes, sino que cada una de ellas exhibe una sensibilidad específica (Gries, 1996). Asimismo, se ha sugerido que la sensibilidad de los líquenes pudiera estar relacionada con su forma de crecimiento, identificándose a las especies de líquenes costrosos y pequeños líquenes foliosos como más tolerantes a la contaminación, seguidas de los líquenes foliosos de mayor tamaño y las formas fruticosas, los cuales se caracterizan por ser aún más sensibles (Brodo *et al.*, 2001; Hawksworth *et al.*, 2005; Escandón *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, las dos especies de líquenes utilizadas mostraron una diferente respuesta a la contaminación. *Flavopunctelia praesignis* se distinguió por ser una especie más tolerante, puesto que su vitalidad se vio menos afectada alrededor de la industria papelera, observándose mayores contenidos de clorofila total y menores síntomas de daños sobre el talo, después de cuatro meses de exposición en el área de estudio. *Usnea ceratina*, por su parte, parece ser una especie menos tolerante a los efectos de contaminación del aire en el área de estudio. Los trasplantes de *U. ceratina* expuestos alrededor de la industria papelera mostraron una menor vitalidad tras el periodo de exposición en comparación con el control, lo cual se vio reflejado en una disminución en el contenido de clorofila total y la presencia de severos síntomas de daños sobre el talo como cambios de cloración, necrosis, erosión de la corteza superior y pérdida de la capa algal.

La capacidad para atrapar y acumular elementos en el área de estudio también varió de manera significativa entre ambas especies de líquenes, observándose que, la mayoría de los elementos estudiados, fueron acumulados principalmente por los trasplantes de *F. praesignis*. Lo anterior, coincide con otros trabajos en los que se ha determinado la habilidad para acumular elementos de diferentes especies de líquenes foliosos sobre líquenes fruticosos (Lawrey y Hale, 1981; Gleen *et al.*, 1995; Garty *et al.*, 1996).

En el presente trabajo, variables como la distancia, orientación y la dirección del viento tuvieron un efecto significativo sobre la vitalidad y la acumulación de elementos en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina* expuestos en el área de estudio. En general, para ambas especies de líquenes, pudimos observar que los sitios de monitoreo con

menores contenidos de clorofila total y mayores síntomas de estrés coincidieron con aquellos cercanos al área industrial y la zona urbana, en los que se determinó una mayor acumulación de elementos. Caso contrario a los sitios en los que la acumulación de elementos fue menor y donde los trasplantes mostraron una mayor vitalidad.

Dichos patrones coinciden con lo observado en otros estudios, en los que altas concentraciones de elementos tienen un importante efecto sobre diferentes parámetros fisiológicos en líquenes como lo es el contenido de pigmentos fotosintéticos. González y Pignata (1994), determinaron que altas concentraciones de Al, Co, Fe, Pb y Zn llevaron consigo a la reducción del contenido de clorofila *a* en trasplantes de *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog. expuestos en sitios urbanos con diferentes niveles de tráfico vehicular y de contaminación industrial, esto en la ciudad Córdoba, Argentina. De manera similar, Garty *et al.*, (2001) observaron menores contenidos de clorofila y bajas tasas fotosintéticas en trasplantes de *Ramalina lacera* (With.) J. R. Laund, expuestos en sitios con altos niveles de contaminación por metales (Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V y Zn) alrededor de un área industrial en Haifa Bay, Israel. Por su parte, Bajpai *et al.*, (2010) determinaron una correlación negativa entre las concentraciones de Al, Cr, Fe, Pb y Zn y el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total) en talos *Pyxine cocus* (Nyl.) creciendo cerca de una central térmica en el distrito Raebareli, al norte de India.

Referencias

- Brodo, I. M., Duran-Sharnoff, S., Sharnoff, S. 2001. Lichens of North America. Yale University Press, New Haven, Londres.
- Bajpai, R., Upreti, D. K., Nayaka, S., Kumari, B. 2010. Biodiversity, bioaccumulation and physiological changes in lichens growing in the vicinity of coal-based thermal power plant of Raebareli district, north India. *J. Hazard. Mater.* 174: 429-436.
- Escandón, D. D., Soto, M. E., Lücking, R., Silverstone, S., P. A. 2016. Corticolous lichens as environmental indicators of natural Sulphur emissions near the Sulphur mine El Vinagre (Cauca, Colombia). *The Lichenologist*, 48(2):147-159.
- Garty, J., Kauppi, M., Kauppi, A., 1996. Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites. *J. Environ. Qual.* 25: 265-272.

- Garty, J., Tamir, O., Hassid, I., Eshel, A., Cohen, Y., Karnieli A., Orlovsky, L. 2001. Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance in lichens exposed to air pollution. *J. Environ. Qual.* 30: 884-893.
- Gries, C. 1996. Lichens as indicators of air pollution. En: Nash III, T. H. (ed.), *Lichen biology*, pp. 241-254. Cambridge University Press, Nueva York, EUA.
- González, M. C., Pignata, L. M. 1994. The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulphur and heavy metals in a transplanted lichen. *Chemistry and Ecology*, 9(2): 105-113.
- Glenn, M. G., Gomez-Bolea, A., Lobello, R. 1995. Metal content and community structure of cryptogam bioindicators in relation to vehicular traffic in Montseny Biosphere Reserve (Catalonia, Spain). *The Lichenologist*, 27: 291-304.
- Hawksworth, D. L., Iturriaga, T., Crespo, A. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medioambientales en los trópicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 71-82.

7. CONCLUSIONES GENERALES

- Después de cuatro meses de exposición en el área de estudio, fue posible determinar un efecto de la contaminación del aire sobre la vitalidad y la acumulación de elementos en los trasplantes de *F. praesignis* y *U. ceratina*.
- La industria papelera es una fuente importante de emisiones en el área de estudio durante la producción de pulpa de celulosa y papel. Altos niveles de acumulación de Al, As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni y V fueron encontrados en sus alrededores.
- Una estrecha relación se observó entre la vitalidad de las especies y el contenido de elementos en el talo. Altos valores de vitalidad se observaron en los sitios con menores niveles de contaminación como los sitios control y el sur del área de estudio; mientras que, mayores síntomas de estrés fueron registrados en los sitios más contaminados como son las inmediaciones de la industria papelera, las zonas de cultivo, los caminos transitados por vehículos y la zona urbana de Morelia.
- La acumulación de elementos en líquenes depende de la especie, así como de sus características morfológicas y su tolerancia a la contaminación, Lo anterior es un criterio importante a considerar al momento de seleccionar una o más de líquenes como biomonitores. En nuestro trabajo, el líquen folioso *Flavopunctelia praesignis* fue una especie más tolerante a la contaminación que el líquen fruticoso *Usnea ceratina*, por lo cual se propone su uso en estudios de biomonitorio a largo plazo.
- Las diferencias en los patrones de acumulación de las dos especies de líquenes estudiadas nos indican diferentes fuentes de origen de los elementos. En nuestro caso, algunos de los elementos tienen su origen en el suelo, mientras que otros provienen de fuentes antropogénicas como son la quema de combustibles fósiles en el área industrial y zonas urbanas, el tráfico vehicular en carreteras y caminos, el uso de fertilizantes y pesticidas en las zonas de cultivo, entre otras.

- Contrario a lo esperado, las concentraciones de la mayoría de los elementos incrementaron con la distancia de la papelera. Lo anterior, estaría relacionado con factores como los vientos dominantes, los cuales influyen sobre los patrones de dispersión y deposición de los contaminantes.
- Las zonas con mayor alteración fisiológica y de mayor acumulación de elementos corresponden a los sitios ubicados en las direcciones este (cerca de la ciudad de Morelia), norte (en la localidad de San Juanito Itzícuaru) y oeste (en la localidad de la Mintzita y Arcos de San Antonio). Otra zona de importante de perturbación se registró en las inmediaciones de la fábrica de papel y celulosa. De acuerdo con nuestros resultados, el sur del área de estudio (hacia la localidad de Cointzio) sería la zona de menor afectación.

8. RECOMENDACIONES

- Es importante considerar que los resultados de este trabajo nos ayudan a conocer los patrones con los que los diferentes elementos encontrados se distribuyen y acumulan en el área de estudio, es decir, que solo podemos reconocer aquellas áreas con mayor o menor deposición de contaminantes. Por lo cual, estudios más profundos acerca del posible efecto de la acumulación de estos elementos en el área de estudio, son necesarios.
- Es importante realizar el monitoreo de otros contaminantes que se sabe son emitidos particularmente por la industria papelera, tales como dióxido de azufre (SO₂), ácido sulfhídrico (H₂S) y mercaptanos.
- Con la finalidad de conocer mejor los patrones de acumulación de los diferentes contaminantes en el área de estudio, se recomienda realizar monitoreos a largo plazo, considerando las diferentes estaciones (invierno, primavera, verano, otoño) o épocas (seca o húmeda) del año.
- La selección de una especie como biomonitor debe considerar sus características para acumular elementos y su tolerancia a la contaminación.
- En general, un periodo corto de exposición (1 a 3 meses) es recomendado. Periodos largos de exposición pueden traer consigo severos daños sobre la vitalidad de las especies más sensibles y, por lo tanto, tener efectos sobre su capacidad para acumular elementos.
- El contenido de clorofila es un parámetro relativamente fácil de medir; sin embargo, cambios en otros parámetros fisiológicos relacionados con el fotobionte (como la capacidad de intercambio de CO₂, la tasa neta de fotosíntesis, la fluorescencia de la clorofila y la degradación de clorofila a feofitina) pueden ser detectados más tempranamente.

- Durante la colocación de los trasplantes, factores como la topografía y la dirección de los vientos dominantes en el área de estudio deben ser tomados en cuenta para mejores resultados.