



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**EFFECTO DEL DERRAME DE HIDROCARBUROS SOBRE
UNA ESPECIE DE MANGLE**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL - SUELO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS
P R E S E N T A :

BIÓL. GABRIELA MARISOL VÁZQUEZ CUEVAS

TUTORA:
DRA. ROSA MARÍA FLORES SERRANO



JUNIO DE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. ENRIQUE CESAR VALDÉZ
Secretario: M.I. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ PALACIOS
Vocal: DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
1^{er}. Suplente: DRA. ROSA MARÍA FLORES SERRANO
2^{do}. Suplente: DR. IVÁN MORENO ANDRADE

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

TUTORA DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA FLORES SERRANO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de lograr esta meta.

A mi alma máter, la Universidad Autónoma Metropolitana, que sin duda me proporcionó bases académicas y éticas invaluable.

A la Dra. Rosa María Flores por todo su apoyo, paciencia y comprensión, no pude haber tenido una mejor tutora.

A la Dra. Rosario Iturbe, M. en C. Guillermina Pérez y Q. Adriana Ramírez por su ayuda y consejos durante estos años.

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Margarita Collazo y el M.I. José Luis Martínez, por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

A todas las personas que me apoyaron en el trabajo de campo, sin el cual todo esto no hubiera sido posible.

A mis compañeros y amigos, porque en los momentos más pesados siempre hubieron palabras de apoyo, especialmente a Miriam, Nancy, Rubí, Flor, Candi, Ulises, Alfredo y Raúl.

A todo el personal del Instituto de Ingeniería que me apoyó.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico proporcionado para la realización de mis estudios.

DEDICATORIA

A Dios y a la vida, sé que soy muy afortunada por todo lo que se me ha dado.

A mis padres y hermanos, que a pesar de todo siempre me han apoyado. Este logro también es de ustedes.

A mis amigos de siempre, que algunos, pese a la distancia me han dado ánimos y su apoyo incondicional: Marisela y Alejandra que siempre han estado conmigo. Esmeralda, sabes que antes de ser mi prima eres mi amiga. Uzbekia que después de tantos años sigues estando conmigo y Barak, sé que contaré contigo toda mi vida.

A los amigos que tuve la oportunidad de conocer gracias esta maestría, sin ustedes esto hubiera sido cien veces más pesado y mil veces menos divertido. Miriam por regañarme cuando me lo merecía y sobre todo por escucharme, Nancy por hablar mi mismo idioma, Ulises porque simplemente no se que hubiera hecho sin ti y Alfredo por siempre estar ahí.

De corazón, todo lo que soy al día de hoy es gracias a ustedes y sé que nunca hubiera llegado a este punto de mi vida sin el cariño y la enseñanza de cada uno de ustedes.

Los quiero.

*"It is not the strongest of the species that survives,
nor the most intelligent that survives.
It is the one that is the most adaptable to change"*
Charles Darwin

CONTENIDO

RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
3. OBJETIVOS Y ALCANCES	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos particulares	20
3.3 Alcances	21
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1 Humedales	22
4.1.1 <i>Biología y ecología de los manglares</i>	23
4.1.2 <i>Avicennia germinans</i>	25
4.1.3 <i>Bienes y servicios prestados por los manglares</i>	26
4.2 Hidrocarburos	27
4.2.1 <i>Efectos de los hidrocarburos en manglares</i>	30
4.3 Indicadores ambientales	34
4.3.1 <i>Índice de Contenido de Clorofila (ICC)</i>	36
4.3.2 <i>Fluorescencia de la clorofila a</i>	37
5. ZONA DE ESTUDIO	40
5.1 Factores bióticos y abióticos	40
5.2 Problemática ambiental	41
6. METODOLOGÍA	43
6.1 Tamaño de la muestra y procedimiento de muestreo	47

6.1.1 Individuos de mangle	47
6.1.2 Muestras foliares	48
6.1.3 Muestras de suelo	51
6.2 Análisis de las muestras foliares	52
6.2.1 Determinación de clorofila por el método destructivo	52
6.2.2 Biomasa foliar	54
7.2.3 Superficie foliar	54
6.3 Análisis de las muestras de suelo	55
6.3.1 Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP)	55
6.3.2 Nutrientes	57
6.3.3 pH	57
6.3.4 Salinidad	58
7. RESULTADOS	60
7.1 Comparación de dos métodos de cuantificación de clorofila	60
7.2 Comparación estadística de las variables entre sitios	63
7.2.1 Concentración de clorofila	63
7.2.2 Biomasa y superficie foliar	64
7.2.3 Eficiencia fotosintética	67
7.2.4 Parámetros estructurales	68
7.2.5 Hidrocarburos fracción pesada (HFP)	70
7.2.6 pH	71
7.2.7 Nitrógeno total	72
7.2.8 Fósforo aprovechable	73
7.2.9 Salinidad	74
7.3 Correlación entre los parámetros analizados	75
7.4 Análisis factorial 2^k	80
8. DISCUSIÓN	83

8.1 Comparación de dos métodos de cuantificación de clorofila	83
8.2 Comparación de las variables entre sitios	84
8.3 Correlación entre los parámetros analizados	92
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
9.1 Conclusiones	97
9.2 Recomendaciones	98
10. REFERENCIAS	99
11. ANEXOS	112
11.1 Anexo 1: Hojas de campo	112
11.1.1 Hoja de campo No. 1: Datos generales de la parcela	112
11.1.2 Hoja de campo No. 2: Datos generales de los árboles	113
11.1.3 Hoja de campo No. 3: Muestras foliares	114
11.1.4 Hoja de campo No. 4: Extracción de pigmentos fotosintéticos	115
11.1.5 Hoja de campo No. 5: Intensidad lumínica	116
11.1.6 Hoja de campo No. 6: Fluorescencia de la clorofila	117
11.1.7 Hoja de campo No. 7: Conteo foliar	118
11.1.8 Hoja de campo No. 8: Superficie foliar	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1	Variables cuantificadas y métodos utilizados.	44
Tabla 7.1	Coefficientes de correlación del índice de contenido de clorofila respecto a los pigmentos fotosintéticos evaluados.	62
Tabla 7.2	Matriz de correlación de las variables cuantificadas para el Sitio Testigo.	76
Tabla 7.3	Matriz de correlación de las variables cuantificadas para el Sitio Contaminado.	78
Tabla 7.4	Matriz de correlación de las variables cuantificadas para ambos sitios.	79
Tabla 7.5	Combinaciones de tratamientos utilizadas en el análisis factorial.	81
Tabla 7.6	Coefficientes del análisis factorial.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1	Diagrama de <i>Avicennia germinans</i> . Modificado de: UMCES, 2012	25
Figura 4.2	Parámetros generales evaluados por la fluorescencia de la clorofila α . Modificado de Hansatech, 2006	38
Figura 5.1	Zona de estudio	42
Figura 6.1	Diagrama metodológico	45
Figura 6.2	Proceso de colecta y marcado de las hojas de mangle	49
Figura 6.3	Determinación de la eficiencia fotosintética con el equipo Pocket PEA de Hansatech	51
Figura 6.4	Determinación de clorofila por el método de extracción con acetona al 80%	53
Figura 6.5	Medición de la salinidad por medio de la conductividad eléctrica	59
Figura 7.1	Correlación de clorofila $a+b$ (mg l^{-1}) respecto al índice de contenido de clorofila	61
Figura 7.2	Correlación de la clorofila $a+b$ respecto al índice de contenido de clorofila	62
Figura 7.3	Concentración de clorofila $a+b$	64
Figura 7.4	Biomasa foliar	65
Figura 7.5	Superficie foliar	66
Figura 7.6	Eficiencia fotosintética	67
Figura 7.7	Índice de desempeño	68
Figura 7.8	Altura total de <i>A. germinans</i>	69
Figura 7.9	Diámetro a la altura del pecho (DAP) de <i>A. germinans</i>	70

Figura 7.10	Hidrocarburos fracción pesada	71
Figura 7.11	pH del suelo	72
Figura 7.12	Nitrógeno total	73
Figura 7.13	Fósforo aprovechable	74
Figura 7.14	Salinidad	75
Figura 7.15	Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en el Sitio Testigo	76
Figura 7.16	Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en el Sitio Contaminado	78
Figura 7.17	Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en ambos sitios	80

GLOSARIO

- Carotenoides** Pigmentos rojos, anaranjados o amarillos involucrados en el proceso de captación de la energía lumínica en la fotosíntesis y para prevención de la fotooxidación de las clorofilas.
- Clorofila** Pigmento verde que actúa como receptor de la energía lumínica en la fotosíntesis.
- Fotosíntesis** Proceso metabólico específico de ciertas células de los organismos autótrofos, por medio del cual se sintetizan sustancias orgánicas a partir de otras inorgánicas, utilizando energía luminosa.
- Fotosistema** Conjunto de clorofila y otros pigmentos, conformado por una antena colectora de energía lumínica y un centro de reacción fotoquímico.
- Neumatóforos** Tipo de raíz caracterizada por su crecimiento hacia la superficie (aérea), asociada a especies vegetales localizadas cerca o en cuerpos de agua.

NOMENCLATURA

CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
DAP	Diámetro a la altura del pecho.
DOF	Diario Oficial de la Federación.
EPA	Environmental Protection Agency.
ERA	Evaluación de riesgo ambiental.
ERE	Evaluación de riesgo ecológico.
ERSH	Evaluación de riesgo a la salud humana.
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
HFL	Hidrocarburos fracción ligera.
HFM	Hidrocarburos fracción media.
HFP	Hidrocarburos fracción pesada.
ICC	Índice de contenido de clorofila.
LGPGIR	Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos.
MassDEP	Massachusetts Department of Environmental Protection.
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
TPHCWG	Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo general determinar el efecto de la contaminación con una mezcla de hidrocarburos sobre una especie de mangle, *Avicennia germinans*, a través de la concentración de clorofila como indicadora de daño en la fotosíntesis en la especie. Para ello se compararon dos sitios, uno denominado Sitio Contaminado (SC) y otro Sitio Testigo (ST). En el caso del primero se presentan mayores concentraciones de hidrocarburos en el suelo, medidos como hidrocarburos fracción pesada (HFP), caso contrario al Sitio Testigo.

Se analizaron diversos parámetros fisiológicos de *A. germinans* adicionales al contenido de clorofila (índice de contenido de clorofila, biomasa y superficie foliar, eficiencia fotosintética, índice de desempeño, diámetro a la altura del pecho y altura total) y características químicas del suelo consideradas como importantes para el desarrollo de la especie (HFP, pH, nitrógeno total, fósforo aprovechable y salinidad). Lo anterior con el propósito de identificar, por un lado, los efectos que pudiera tener en la especie de mangle la presencia de los hidrocarburos y, por otro lado, los factores ambientales diferentes a los hidrocarburos que pudieran tener un efecto en el organismo estudiado.

De forma simultánea, se analizó la factibilidad de la sustitución del método tradicional de cuantificación de clorofila (método destructivo) por un método no destructivo que utiliza un medidor portátil, esto con el propósito de evaluar la posibilidad del uso de la clorofila como un indicador ambiental de exposición a hidrocarburos para la especie en cuestión.

Los resultados obtenidos muestran que todas las variables fisiológicas evaluadas presentaron diferencias significativas entre los sitios, reflejando condiciones más desfavorables en el SC. En el caso de los parámetros del suelo cuantificados, el pH y nitrógeno total no presentaron diferencias significativas entre los sitios, caso contrario a los HFP y salinidad que fueron mayores en el SC y el fósforo aprovechable que presentó las concentraciones más altas en el ST.

La comparación entre los dos métodos de cuantificación de clorofila utilizados en este trabajo, por análisis del coeficiente de correlación fue menor a 0.5, siendo un

valor sumamente bajo como para considerar la sustitución del método destructivo por el método no destructivo.

En el caso de las variables del suelo analizadas, únicamente el fósforo aprovechable y la salinidad mostraron tener diferencias significativas entre ambos sitios, sin embargo, se presentaron valores que no comprometen el desarrollo de la especie, y en el caso del fósforo aprovechable, se presentaron contenidos superiores a los reportados en la literatura para este tipo de ecosistema.

Con base en los resultados de ambos sitios (Contaminado y Testigo) se realizó el análisis de los coeficientes de determinación y correlación con el propósito de determinar qué variables presentaban una mayor interacción. Mediante éste fue posible determinar que la eficiencia fotosintética tiene una alta relación con la concentración de HFP en el suelo, al presentar un coeficiente de correlación general de -0.91.

El resto de las variables analizadas mostraron interacciones con coeficientes de correlación menores a 0.67, sin embargo, en el caso de la salinidad, ésta mostró tener una tendencia a afectar a todas las variables fisiológicas y estructurales cuantificadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron llegar, entre otras, a la conclusión de que los HFP sí están teniendo un efecto dañino sobre las variables fisiológicas y estructurales evaluadas en la especie *A. germinans*, aunque contrario a lo que se esperaba, este efecto no fue tan importante en el caso del contenido de clorofila pero, como ya se mencionó, este efecto nocivo sí es claro sobre la eficiencia fotosintética.

Con lo anterior fue posible descartar el uso del índice de contenido de clorofila como un indicador ambiental, al presentar bajas correlaciones respecto al método tradicional para la cuantificación de esta variable. Por otro lado, la eficiencia fotosintética mostró tener una buena sensibilidad ante la presencia de hidrocarburos en el suelo, por lo que podría ser utilizada como un indicador ambiental de exposición a este contaminante para la especie estudiada.

ABSTRACT

This study had as major objective to establish if the soil hydrocarbons have an effect on the chlorophyll concentration on the mangrove specie *Avicennia germinans*. To accomplish this, it was performed a comparison between two sites, a Contaminated and a Control Site, in both cases, mangrove were the dominant ecosystem. The first site presented the highest heavy fraction hydrocarbons (HFH) concentration, which is the opposite of the control site.

There were analyzed several physiologic parameters of *A. germinans* in addition of the chlorophyll concentration (chlorophyll content index, foliar biomass and surface, photosynthetic performance, performance index, diameter at breast high and total height) and some chemical soil characteristics, which are considered as important elements for the plant development (HFH, pH, total nitrogen, available phosphorus and salinity).

At the same time, it was analyzed the feasibility of the use of a chlorophyll quantification non-destructive method instead of the traditional and destructive one. By doing this, it could be possible to establish the viability of using the chlorophyll content as an environmental indicator of the *A. germinans* exposure to the hydrocarbons. This was made to identify the effects that may be occurring in the mangrove tree due to the hydrocarbons presence, and in the other hand the environmental factors that also could be having an effect on the study specie.

As a result of this study, it can be observed that all the physiological parameters show significant differences among sites, allowing to observe less favorable conditions in the Contaminated Site. Talking about the soil parameters, in this case, total nitrogen and pH didn't show differences among sites, nevertheless HFH and salinity did it, having in the first case higher concentrations in the Contaminated Site, and in the second one the opposite conditions.

In the case of the comparison between both methods of chlorophyll quantification that were evaluated on this study, it was performed a correlation coefficient analysis, which was lower than 0.5, meaning that those methods can't be considered equivalent and therefore, it can't be replaced the destructive method for the non-destructive one.

Taking as a base the results from both sites (Contaminated and Control), it was made a determination and correlation analysis, looking for find if there was any variable that had a direct influence above another one. Due to this, it was possible to observe that the photosynthetic performance had a high inverse correlation with the HFH, having a correlation coefficient of -0.91.

The rest of the parameters had, in general, coefficients lower than $|0.67|$, nevertheless, soil salinity show the tendency of having the effect to decrease the rest of both physiological and structural variables.

Those results allow to conclude that the HFH are having a harmful effect over the physiological and structural variables that were quantified for *A. germinans*, however not as it was expected in the case of the chlorophyll concentration.

Considering all, it can be discharge the use of the chlorophyll content index as an environmental indicator due to the low correlation between this method and the traditional one, nevertheless, it can be appreciated this potential in the photosynthetic performance parameter, allowing to analyze its performance as an stress indicator for *A. germinans* exposed to HFH.

j

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la actividad de la industria petrolera en México, uno de los principales problemas de contaminación en las costas del Golfo de México es la presencia de hidrocarburos tanto en el agua como en el suelo (Gallegos, 1986). A pesar de lo anterior, se reportan pocos trabajos de campo que estudien la relación entre las especies de vida silvestre y la concentración de los hidrocarburos en el suelo así como sus efectos.

Lo anterior cobra mayor importancia al considerar que dichas relaciones pueden ser de utilidad en diversos estudios, tales como las evaluaciones de riesgo ambiental mediante la identificación y análisis de posibles indicadores o especies centinela, permitiendo el desarrollo de programas de manejo adecuados. Para este fin, se recomienda el uso de productores primarios como indicadores de estrés en ecosistemas debido a su función como base de la cadena alimenticia (Evans *et al.*, 2003).

Los ecosistemas de manglar son reconocidos por su alta productividad, así como por sus múltiples funciones como barrera protectora de las líneas de costa contra los procesos de erosión y eventos climatológicos como huracanes (Gallegos, 1986; Lugo y Snedaker, 1974). Se reconoce que éstos son sistemas frágiles y sensibles, especialmente a presiones antropogénicas como la deforestación, cambio de uso del suelo y contaminación (Rani *et al.*, 2010).

Este trabajo evalúa en campo el impacto de la presencia de hidrocarburos en el suelo sobre la concentración de clorofila en *Avicennia germinans* en una población natural localizada en el estado de Veracruz, México. La clorofila fue elegida como el parámetro indicador debido a su papel fundamental en el proceso fotosintético, el cual es básico para la subsistencia de todo organismo vegetal.

Por otra parte, se evaluaron otros factores fisiológicos y estructurales de los individuos de la especie de mangle seleccionada (eficiencia fotosintética, biomasa, superficie foliar, diámetro a la altura del pecho y altura) que pueden verse afectados por la presencia de los hidrocarburos, así como otras variables

ambientales que también pudieran tener un efecto en el desarrollo de los organismos en estudio (nitrógeno total, fósforo aprovechable y salinidad).

Todos los parámetros mencionados se cuantificaron en dos sitios, uno denominado Sitio Contaminado (SC), caracterizado por ser un área con alta concentración de hidrocarburos y otro considerado como Sitio Testigo (ST) debido a la nula o escasa presencia de hidrocarburos en él.

De forma adicional, se buscó la validación de una técnica de cuantificación de clorofila por un método no destructivo utilizando un medidor portátil (Opti-Sciences CCM-200) respecto a la metodología tradicional de extracción de pigmentos fotosintéticos por medio de acetona al 80 %. Este objetivo adquiere mayor importancia al considerar que la validación de un método no destructivo ofrece múltiples beneficios tales como la reducción de tiempo y costos, así como evitar el uso de sustancias tóxicas y por ende de residuos peligrosos para el hombre y el ambiente.

2. ANTECEDENTES

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se eligió un sitio contaminado por hidrocarburos en el norte del estado de Veracruz, en el cual el Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México realizó un estudio previo en el año 2007. Ese estudio tuvo como propósito conocer los niveles de hidrocarburos de fracción ligera (HFL), hidrocarburos fracción media (HFM) e hidrocarburos fracción pesada (HFP) en el suelo, de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA-2003 (DOF, 2005), así como la estimación del riesgo para los organismos por la exposición a estos compuestos. Donde como parte de los resultados se obtuvo que el percentil 95 de los HFP en los primeros 20 cm. de suelo superó el límite máximo permisible establecido por la norma antes mencionada, con un valor superior a los 70 000 mg·kg⁻¹.

El sitio de estudio se caracteriza por haber tenido aportes de hidrocarburos de manera periódica por varias décadas, y en el proyecto mencionado se determinó que la especie vegetal con mayor valor de importancia relativa es *A. germinans*, haciendo de este lugar un área ideal para el estudio de las respuestas de esta especie ante la contaminación crónica de hidrocarburos.

En el estudio de 2007, se observó que en las áreas que presentaron una mayor concentración de hidrocarburos en el suelo se localizaban individuos de mangle con una menor altura, así como una menor densidad en su población; éstas observaciones permitieron establecer un posible efecto negativo de esta perturbación antropogénica sobre la estructura de los individuos en el ecosistema de manglar; sin embargo, el tipo de metodología utilizada en dicho estudio no hizo posible determinar si se presentaba el mismo efecto a nivel fisiológico sobre los individuos de mangle. Aunado a lo anterior, no existe una amplia información de estudios de campo acerca del efecto de los hidrocarburos en el funcionamiento fisiológico de poblaciones de *A. germinans*.

Debido a lo anterior, se planteó el presente trabajo de tesis para evaluar el efecto de los hidrocarburos sobre la concentración de clorofila y otras variables fisiológicas de *A. germinans*, así como características del suelo.

3. OBJETIVOS Y ALCANCES

3.1 *Objetivo general*

Determinar si la mezcla de hidrocarburos (fracciones ligera, media y pesada) produce un efecto en la concentración de clorofila de una especie de mangle.

3.2 *Objetivos particulares*

- Determinar las diferencias en la concentración de clorofila la altura y diámetro a la altura del pecho de los individuos de *Avicennia germinans* localizados en áreas con diferente concentración de hidrocarburos en el suelo.
- Comparar y correlacionar los resultados obtenidos en la medición de clorofila de la especie *A. germinans* con el medidor portátil Opti-Sciences CCM-200 (método no destructivo) respecto a los determinados por el método de extracción por acetona al 80% (método destructivo).
- Establecer si existe relación entre las concentraciones de clorofila estimadas por ambos métodos respecto a los valores de salinidad, nitrógeno total y fósforo aprovechable en el suelo.
- Determinar si existen diferencias en la eficiencia fotosintética en los individuos de *A. germinans* en áreas con diferente concentración de hidrocarburos en el suelo.
- Establecer la factibilidad del uso de la clorofila como un indicador biológico de la exposición a hidrocarburos en la especie *A. germinans*.

3.3 Alcances

En el área de estudio se ha documentado la presencia de las fracciones ligera, media y pesada de hidrocarburos, de las cuales la fracción pesada es de mayor importancia tanto por la magnitud de las concentraciones como por su distribución. Esto se explica por el proceso de intemperización al cual ha estado sometido el hidrocarburo, ya que han transcurrido varias décadas desde el evento de contaminación original. Si bien se han tenido aportaciones recientes debido a emanaciones remanentes de la fuente de contaminación, éstas no han sido muy importantes comparadas con la explosión del pozo de extracción de petróleo, el cual afectó cerca de 300 hectáreas.

Por lo anterior, la fracción pesada de los hidrocarburos (HFP) será tomada como representativa de este evento de contaminación. Ésta decisión, obedece también a la facilidad y economía que implica la determinación de las concentraciones de esta fracción respecto a la media y ligera.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Humedales

Los humedales son definidos como “extensiones de marismas, pantanos y turberas o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas” (UNESCO, 1987).

Estos ecosistemas se caracterizan por presentar condiciones tanto acuáticas como terrestres, teniendo como producto uno de los sistemas ecológicos más complejos y productivos del mundo. Las características ambientales que determinan principalmente la condición de humedal son el tipo y periodicidad de los procesos hidrológicos, pudiendo ser de agua dulce, salobre o salada y presentar fluctuaciones diarias o estacionales, lo anterior dependiendo de las condiciones climáticas y de la ubicación geográfica de cada sitio. Debido a que estas condiciones son sumamente variables, existen diferentes tipos de humedales (Bacon, 1997).

Otro factor que condiciona la presencia de los humedales son las características topográficas; bajo esta premisa es posible clasificar a estos ecosistemas en tres tipos: los que se desarrollan sobre depresiones, llamados humedales de depresión; los que se desarrollan a lo largo de orillas someras e inundables de forma periódica y se denominan humedales de ribera, y, por último, se reconocen los humedales costeros, que se desarrollan en las costas de grandes lagos y del mar (Smith y Smith, 2001), los manglares es la vegetación dominante en estos últimos.

Al ser ecosistemas altamente productivos, sus principales funciones ecológicas son la regulación de los ciclos hidrológicos, siendo puntos de recarga de aguas subterráneas, actúan como embalses naturales para el control de inundaciones, filtros de contaminantes en el agua tales como nitrógeno, fósforo, sulfatos y algunos metales pesados, los cuales generalmente son acumulados en el suelo y sedimento (Smith y Smith, 2001; UNESCO, 1987).

Aunado al valor biológico y científico de los humedales, éstos constituyen además un recurso de gran valor económico, cultural y recreativo (UNESCO, 1987). En el

aspecto económico, las actividades que se pueden desarrollar en este tipo de ecosistemas son variables y dependen principalmente de las características específicas de cada lugar, por lo que no pueden ser generalizadas.

En las llanuras mareales de las costas tropicales se distribuyen los bosques de mangle, caracterizados, entre otros factores, por localizarse en zonas intermareales, lo que permite la acumulación del sedimento, siendo reconocidos por ser de los humedales costeros con mayor desarrollo y productividad (Smith y Smith, 2001).

4.1.1 *Biología y ecología de los manglares*

Los ecosistemas de manglar se definen formalmente como una formación vegetal leñosa que puede ser arbórea o arbustiva y se pueden componer de una o varias especies. A nivel mundial se reconocen 54 especies de mangles verdaderos correspondientes a 20 géneros y 16 familias, donde 30 especies pertenecen a una de las dos familias con mayor distribución: Avicenniaceae y Rhizophoraceae (Hogarth, 1999). En México predominan cuatro especies: *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), *Avicennia germinans* L. (mangle negro), *Laguncularia racemosa* L. (mangle blanco) y *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo), las cuales se pueden encontrar formando asociaciones vegetales o en bosques monoespecíficos (CONABIO, 2009). Los árboles de mangle pueden llegar a medir más de 30 metros de altura y pueden abarcar dimensiones de miles de hectáreas de superficie. En el área de estudio se localizan individuos de estas cuatro especies, dominando *A. germinans*.

Los manglares comprenden áreas extensas de los ambientes costeros en las zonas tropicales y subtropicales del planeta, se localizan en la interfase entre los ecosistemas marino y terrestre, sobresaliendo por su alta diversidad de especies asociadas y los múltiples servicios que ofrecen a las comunidades humanas tanto a nivel local como global (FAO, 2010). Los principales factores ambientales que delimitan su distribución son la mezcla de aguas continentales y marinas, una temporada marcada de lluvias, altas temperaturas y una considerable humedad atmosférica (Menéndez y Guzmán, 2006).

Este tipo de ecosistemas son en su mayoría exclusivamente tropicales debido, principalmente, a su susceptibilidad a las bajas temperaturas ya que la mayor parte

de las especies de mangle no pueden sobrevivir a una temperatura ambiental inferior a los 5 °C, pero en raras ocasiones rebasan los límites de la isoterma de 20 °C (Hogarth, 1999).

Por su localización en ambientes costeros y ecosistemas terminales de las cuencas hidrográficas, los manglares presentan características que los distinguen de otros; constituyen uno de los ecosistemas con mayor productividad y riqueza biológica, son hábitat de múltiples especies residentes y temporales, además de representar una fuente importante de nutrientes para ecosistemas adyacentes, como los pastos marinos y los arrecifes de coral (Hogarth, 1999).

Taxonómicamente, las especies de mangle son sumamente variadas, aunque en general se caracterizan por la presencia de raíces aéreas (neumatóforos), teniendo la peculiaridad de ser altamente tolerantes a la salinidad del ambiente. Actualmente las cuatro especies que predominan en México se encuentran clasificadas como amenazadas de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010).

Existen múltiples factores que pueden limitar la productividad y en general la salud de los ecosistemas de manglar, sin embargo, se reconoce que las características del sustrato deben de ser consideradas como uno de los mayores factores que restringen su desarrollo; principalmente el nitrógeno y el fósforo (Boto y Wellington, 1984; Smith y Smith, 2001).

Como ejemplo de lo anterior se encuentran estudios que concluyen que, de forma general, los manglares localizados en Australia se encuentran limitados principalmente por el bajo contenido de fósforo en el suelo (Boto y Wellington, 1983; 1984), mientras que en un área de manglar de Sierra Leona se encontró que a pesar de presentar valores similares en el contenido de nitrógeno, la concentración de fósforo en el suelo era considerablemente mayor que en el ecosistema del manglar australiano; encontrando en ambos casos que dichos elementos (fósforo en el caso de Sierra Leona y nitrógeno en Australia) eran factores limitantes para su desarrollo (Boto y Wellington, 1984; Hesse, 1961).

Además de la limitación a la que se pueden ver sometidas la mayoría de las especies vegetales por la baja concentración nitrógeno y/o fósforo, en el caso

específico de los ecosistemas de manglar existen otras variables particulares que pueden limitar un desarrollo adecuado; referente a esto se ha reportado que la salinidad representa, después de las variables antes mencionadas, una de las limitantes más importantes (Boto y Wellington, 1984), llegando a observarse la muerte de mangles en varias especies, incluso en *A. germinans*, por la alta concentración de sales, a pesar de que dicha especie es de las que presentan mayor tolerancia ante la hipersalinidad (Cardona y Botero, 1998; Tomlinson, 1986).

4.1.2 *Avicennia germinans*

También conocido como mangle negro (Lugo y Snedaker, 1974), la especie se distribuye de forma común en la mayoría de los manglares de las áreas costeras americanas. Su distribución va desde el norte de Florida y la costa del Golfo de México (latitud Norte 29° 53') hasta Espíritu Santo, Brasil (latitud Sur 23°) en el Océano Atlántico y en las costas del Océano Pacífico (latitud Sur 30° 15'), desde el norte de México hasta Perú (latitud Sur 3° 40').

La distribución de esta especie está altamente influenciada por cambios en la microtopografía, así como por los cambios en la inundación del suelo y su salinidad. Generalmente se le puede encontrar en áreas bajas en el margen de los manglares, aunque es capaz de desarrollarse en zonas ligeramente elevadas donde los episodios de inundación ocurren con una menor frecuencia e intensidad (Tomlinson, 1986).

A. germinans se desarrolla en zonas con clima tropical y subtropical bajo un amplio espectro de precipitación que oscila desde los 800 a los 7 000 mm anuales, siendo considerada la especie de mangle más tolerante a las bajas temperaturas, dominando en ecosistemas de manglar localizados en zonas con baja precipitación, donde la salinidad del suelo excede las 40 ppm (Tomlinson, 1986), aunque se puede desarrollar en suelos con una amplia gama de salinidad de hasta 100 ppm. Bajo concentraciones más altas su desarrollo estructural se puede ver reprimido (Lugo y Snedaker, 1974).

Su crecimiento se caracteriza por ser continuo y con ramificación difusa. Su forma y algunos rasgos estructurales pueden llegar a variar significativamente entre poblaciones debido principalmente a las condiciones climáticas y edáficas (Cintrón

et al., 1978; Hogarth, 1999). Una de las características principales de *A. germinans* es su sistema radicular subterráneo superficial (formado por neumatóforos), dicho sistema realiza el intercambio de gases entre la planta y la atmósfera (Lugo y Snedaker, 1974) (ver Figura 4.1).



Figura 4.1 Imagen de *Avicennia germinans*. Con flechas se señalan las raíces aéreas, denominadas neumatóforos.

4.1.3 Bienes y servicios prestados por los manglares

Como parte fundamental para el manejo sustentable de los ecosistemas de manglar es indispensable el conocimiento de los bienes y servicios prestados por estos, sin embargo, se reconoce que una buena parte de ellos no son comercializados de manera directa (CONABIO, 2009).

De forma general se realiza la clasificación de los bienes y servicios en función de si su percepción es *in situ* o *ex situ* y, además, de su clasificación con base en si dichos recursos presentan o no precio en el mercado y los que son utilizados únicamente para el autoconsumo (Sanjuero y Welsh, 2005).

En este aspecto, el uso de los árboles de mangle como especies maderables es uno de los aspectos *in situ* que son considerados con mayor frecuencia durante los estudios y programas de manejo.

De forma específica, *A. germinans* se utiliza principalmente como fuente de leña y carbón en la mayor parte de América tropical, también es utilizada para la elaboración de vigas y otros productos hechos de madera. Su uso como recurso maderable se debe en mayor medida a su buena capacidad de impregnación de ciertos aditivos que prolongan su vida útil (Jiménez y Lugo, 2004).

La segunda actividad comercial más importante es la pesca de alta mar de especies que dependen del manglar en alguna etapa de su ciclo de vida, siendo esta la actividad económica más importante en términos monetarios. Sin embargo, debido a la dificultad para la evaluación cuantitativa de este servicio, pocas veces es sujeto a consideración en la toma de decisiones respecto a la conservación o el manejo sustentable del ecosistema (Sanjuro y Welsh, 2005).

De forma adicional, estos ecosistemas han sido reconocidos por su función como barrera natural de protección de la línea de costa ante la erosión producida por vientos, capacidad de amortiguamiento de los impactos por contaminantes acarreados por las corrientes de agua de ríos y arroyos, filtro biológico, retención y procesamiento de algunos productos utilizados en la agricultura como fertilizantes y plaguicidas, abastecimiento de mantos freáticos, captura de gases de efecto invernadero, así como múltiples servicios con capacidad de ser explotados en términos económicos, como la extracción de madera, obtención de alimento y desarrollo de actividades cinegéticas y turísticas (CONABIO, 2009).

Pese a lo anterior, en la actualidad se reconoce que las actividades humanas representan la mayor amenaza para los manglares. Las principales actividades antrópicas que ejercen presión sobre este ecosistema son la reducción del hábitat por cambio de uso del suelo y la contaminación del mismo. En la región del centro y norte del continente americano las mayores amenazas son la contaminación por escorrentía de fertilizantes y plaguicidas, y la eliminación inadecuada de desechos; sin embargo, se tienen identificadas áreas específicas donde la contaminación por petróleo representa un problema que debe ser considerado con mayor énfasis (Farnsworth y Ellison, 1997; FAO, 2007).

4.2 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son los principales componentes del petróleo crudo, se caracterizan principalmente por contener casi en su totalidad hidrógeno y carbono,

aunque pueden presentar en menor proporción elementos como azufre, nitrógeno y oxígeno (Botello *et al.*, 2005; DOF, 2005; Wauquier, 1994).

De forma tradicional, este tipo de compuestos se clasifican de acuerdo con su estructura en alifáticos y aromáticos, subdividiéndose a su vez en otros grupos. En el caso de los hidrocarburos alifáticos se dividen en alcanos, alquenos, alquinos y cicloalifáticos. Los alcanos o parafinas, tienen solamente enlaces simples y también son conocidos como hidrocarburos saturados, los alquenos u olefinas poseen al menos un enlace doble y los alquinos tienen como mínimo un enlace triple (Acuña, 2006).

Dentro de los hidrocarburos alifáticos, las parafinas tienen predominantemente de 1 a 33 carbonos, donde las más abundantes son las que tienen un grupo metilo en el segundo átomo de carbono. En el caso de las cicloparafinas, al contrario que las parafinas, las más abundantes son las que poseen un número mayor de átomos de hidrógeno sustituidos generalmente con el radical metilo (EPA, 2011; Jiménez, 2001).

Los hidrocarburos aromáticos se caracterizan por tener un núcleo o anillo, razón por la cual, la base de este grupo de hidrocarburos es el benceno. Estos compuestos son conocidos como aromáticos debido a que muchos de ellos se caracterizan por presentar un intenso olor (Gutiérrez, 1985; Jiménez, 2001). Los más abundantes son aquellos con mayor estabilidad respecto al aumento de la temperatura (1,3-dialcohol y 1,2,4-trialcohol-benceno). Cuando éstos presentan dos o más anillos de benceno unidos entre sí se les denomina hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se sabe que de forma general las fracciones pesadas del petróleo son ricas en HAP (Acuña, 2006; Jiménez, 2001).

Las principales características del crudo, en función de las cuales es clasificado, son la densidad, el rendimiento volumétrico de los diferentes productos de la destilación atmosférica y el contenido de azufre; la densidad se mide en grados API (American Petroleum Institute) y se calcula en función de una ecuación que considera el peso específico y parámetros estandarizados (Jiménez, 2001).

En México se extraen aproximadamente 17 tipos de crudo, sin embargo, debido a los volúmenes extraídos son el crudo Istmo (crudo ligero), Maya (crudo pesado) y

Olmeca (crudo superligero), siendo estas mezclas las utilizadas con fines de exportación. De forma general se sabe que el petróleo mexicano se caracteriza por su alto contenido (%) de azufre; por ejemplo, el crudo Maya contiene 3.3% de azufre, mientras el crudo Escravos, originario de Nigeria tiene únicamente 0.1% (INEGI, 2011; Rosas y Rodríguez, 1997).

Al encontrarse hidrocarburos en los medios como producto de diferentes procesos industriales, pueden producir afectaciones en el ambiente y en la salud humana. Se sabe que algunos de sus compuestos, sobre todo los HAP, son carcinógenos y mutagénicos (Mastandrea *et al.*, 2005), produciendo a mediano y largo plazo la reducción de las poblaciones naturales vegetales y animales (Botello *et al.*, 2005), alterando así los procesos naturales de los ecosistemas.

En el caso de los HFP, tal como son definidos por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005), sus efectos en la salud humana no están plenamente identificados, sin embargo, existen estudios toxicológicos evaluados por el Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group (TPHCWG, 1997) para diferentes grupos de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) definidos en función del número de carbonos equivalentes (EC), estos representan los puntos de ebullición equivalentes para los hidrocarburos, siendo ésta la característica física más importante del análisis químico de los componentes de los hidrocarburos, dentro de estos se encuentran los HTP aromáticos con un EC en los intervalos de C_{16} - C_{21} y de C_{21} - C_{35} , siendo similares a los HFP establecidos por la normatividad mexicana (DOF, 2005) que señala que este compuesto debe tener como mínimo C_{18} . En este mismo sentido el Departamento de Protección Ambiental de Massachusetts, en Estados Unidos (MassDEP), realiza otra clasificación de los hidrocarburos, donde, de nuevo por su similitud con los HFP se establece un grupo de hidrocarburos en el intervalo de carbonos de C_{19} - C_{32} (MassDEP, 1994). Cabe señalar que en ambos casos (MassDEP y TPHCWG) se concluye que las causas más evidentes de la presencia de estas sustancias son sus efectos nefrotóxicos sobre los humanos.

De forma general, se reconoce que debido a que fracciones de hidrocarburos con un EC mayor a C_{16} no son compuestos volátiles, la exposición a la inhalación de éstos es mínima, sin embargo, los riesgos por su ingestión son mayores, pudiendo provocar, como ya se mencionó, alteraciones renales, así como hepáticas e

inmunológicas, las cuales pueden desencadenar en un gran número de enfermedades (ASTDR, 1999).

De acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA-2003 (DOF, 2005), la cuantificación de la concentración de hidrocarburos en el suelo, así como la evaluación de la pertinencia de remediación de un área determinada se establece con base en los límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo, haciendo diferenciación entre las fracciones ligera (HFL), media (HFM) y pesada (HFP), lo que corresponde a la mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen cadenas lineales (hidrocarburos alifáticos) de entre cinco y diez átomos de carbono para el caso de la fracción ligera, de entre diez y veintiocho átomos de carbono en la fracción media y más de 18 carbonos en el caso de la fracción pesada.

La pertinencia de aplicar acciones para remediar un sitio contaminado con hidrocarburos se establece comparando las concentraciones en el suelo encontradas en el sitio de interés con los límites máximos permisibles establecidos en la norma mencionada anteriormente (DOF, 2005). Sin embargo, si es imposible cumplir técnica o económicamente con esos valores de remediación, de acuerdo con la normatividad mexicana (DOF, 2005; 2006; 2007), pueden establecerse valores límite alternativos mediante las evaluaciones de riesgo ambiental (ERA); con base en ellas pueden determinarse niveles base específicos de remediación, los cuales tienen como finalidad lograr la disminución de los riesgos de los ecosistemas y del ser humano por exposición a los contaminantes.

4.2.1 Efectos de los hidrocarburos en manglares

Se cuenta con un gran número de registros que indican que las presiones de origen antrópico han tenido como efecto la reducción de la distribución de este ecosistema a nivel global, siendo uno de los hábitats costeros más amenazados, especialmente en los países en vías de desarrollo (Bridgewater y Cresswell, 1999).

En este marco han sido desarrollados múltiples estudios de los impactos de la contaminación sobre aspectos bióticos como el crecimiento de las plantas de mangle, la estructura de sus bosques y la productividad general del ecosistema, pudiéndose demostrar, entre otras cosas, que existe una vulnerabilidad del ecosistema ante perturbaciones extremas como el derrame de hidrocarburos (Cintrón y Shaeffer, 1983; Elster, 2000; Field, 1999; Gallegos, 1986; Lewis, 1983).

Los efectos de los derrames de hidrocarburos sobre las zonas costeras son múltiples, entre éstos se puede mencionar un efecto negativo sobre la flora y fauna de los ecosistemas de mangle, así como a la salud humana. A pesar de que ciertos procesos ambientales contribuyen a la atenuación natural del petróleo, es sabido que al paso del tiempo, los hidrocarburos derramados en ambientes acuáticos tienden a adherirse fuertemente a los sedimentos; en el caso de los manglares, su alta productividad y abundante detritus orgánico los hacen un sitio preferencial para su acumulación (Olguín *et al.*, 2007).

Los manglares son especialmente susceptibles a los derrames de hidrocarburos debido a que frecuentemente se localizan en áreas de extracción o transporte de dicho combustible. Los accidentes más comunes ocurren por la ruptura de ductos, derrames de plataformas y accidentes de buques de transporte (Moreno *et al.*, 2002).

La investigación respecto a los principales efectos que producen los hidrocarburos sobre los ecosistemas costeros, incluyendo a los manglares, ha sido desarrollada con mayor frecuencia a partir de mediados del siglo pasado, permitiendo en la actualidad contar con referencias básicas respecto al tema, dentro de las que sobresalen tres niveles de contaminación por hidrocarburos (Clark y Finley, 1973): alto, moderado y bajo/persistente, siendo este último el de mayor interés para el presente trabajo, por ser definido como la contaminación por concentraciones no letales pero de manera constante, constituida principalmente por hidrocarburos poco visibles en la superficie; este tipo de contaminación se caracteriza por no presentar un efecto adverso inmediato en las poblaciones, permitiendo la intemperización del compuesto. Sin embargo, bajo este tipo de condiciones es cuando se ha detectado que se propicia la acumulación de sustancias tóxicas por los organismos, haciendo visibles los efectos principalmente a largo plazo e incrementando la posibilidad de que dichas sustancias sean transmitidas a las poblaciones humanas (Gallegos, 1986; Jackson *et al.*, 1989). Estos casos de contaminación crónica y subletal han sido reportados como los más importantes en las zona costera del Golfo de México (Gallegos, 1986).

Es necesario considerar el contenido de fracciones tóxicas de los hidrocarburos para la determinación de sus consecuencias, las cuales pueden producir la muerte de poblaciones asociadas al manglar, siendo unas de las más sensibles las bacterias

del suelo (Cintrón y Schaeffer, 1983). Asimismo, debido a las características del suelo y sedimento de los manglares, principalmente el alto contenido de materia orgánica, el hidrocarburo es acumulado tendiendo a resuspenderse y circular en el ecosistema de manera periódica como consecuencia de las inundaciones variables propias de este tipo de ecosistema (Burns *et al.*, 1993).

El estudio de los efectos de los derrames de hidrocarburos sobre los manglares ha permitido establecer de manera general su respuesta a corto plazo, siendo las principales consecuencias la anoxia y muerte de plántulas y árboles cuando el petróleo cubre los neumatóforos, impidiendo el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera. También se sabe que el mangle puede morir por intoxicación directa con los compuestos aromáticos de bajo peso molecular cuando éstos dañan las membranas celulares de las raíces, impidiendo el proceso natural de exclusión de sal típico de este tipo de vegetación (Ellison y Farnsworth, 1996; Olguín *et al.*, 2007), y que es más notorio en *A. germinans*, especie a la que se le reconoce una mayor capacidad de tolerar altos niveles de salinidad respecto a otras especies de mangle (Hogarth, 1999).

Como respuesta directa, se sabe que los manglares han desarrollado mecanismos para solucionar los efectos adversos más evidentes, que son la anoxia y la imposibilidad de excretar el exceso de sal, esto mediante el cambio en la orientación de los neumatóforos y hojas, principalmente (NOAA, 2010). De forma general, se reconoce que este ecosistema se encuentra expuesto de manera directa al efecto de las fracciones solubles tóxicas del petróleo, a los productos fraccionados por el intemperismo del petróleo residual, al impacto de los compuestos tóxicos en las poblaciones microbianas del suelo y, finalmente, como consecuencia de lo anterior, al desencadenamiento de otros procesos en distintos niveles del ecosistema (Cintrón y Schaeffer, 1982).

En el caso de México, a pesar de que se ha observado un incremento en la realización de estudios sobre la contaminación por hidrocarburos en sistemas costeros (Botello *et al.*, 2005), a partir de la década de 1980 los derrames de hidrocarburos han seguido ocurriendo, por lo que esta perturbación es considerada como una de las mayores amenazas contra los bosques de mangle (NOAA, 2010).

Los efectos a largo plazo no han podido ser generalizados ya que parecen ser particulares para las diferentes especies de plantas y animales de los bosques de mangle, dependiendo de la concentración, tipo y carga del hidrocarburo, factores geográficos, ambientales y biológicos, y las interacciones entre éstos, lo que determina que los periodos de recuperación puedan variar de unos cuantos días a más de diez años (IPIECA, 1991; Klekowski *et al.*, 1994b; Olgún *et al.*, 2007).

Una de las consecuencias a largo plazo que ha sido reportada en los mangles, es la disminución de la biomasa foliar de *R. mangle* asociada a zonas que presentaban concentraciones altas de petróleo (Duke *et al.*, 1997) y desarrollo de una mayor densidad de neumatóforos en *A. marina* (Dicks, 1986). Como consecuencia de la contaminación crónica debida a los hidrocarburos, se han observado daños a nivel estructural y funcional de los mangles. Por ejemplo, en Australia y la zona costera del Mar Caribe se reportó la aparición de individuos del género *Avicennia* deficientes de clorofila α , así como una fuerte correlación entre la concentración de hidrocarburos en los sedimentos con la dominancia de este género (Duke y Watkinson, 2002). También han sido reportadas áreas donde se presentan casos de clorosis foliar (deficiencia de clorofila) asociados directamente a la concentración de hidrocarburos en el suelo (NOAA, 2010).

Las clorofilas son los pigmentos propios de las plantas verdes, esenciales para el desarrollo de los organismos vegetales ya que el conjunto de estos captan la energía solar (fotones) para que se inicie el proceso fotosintético. La reducción del contenido de clorofila conlleva a una menor capacidad de captación de la luz por lo tanto la disminución del proceso de la fotosíntesis, sin el cual las plantas son incapaces de sobrevivir al no obtener los carbohidratos producto de dicho proceso (Curtis y Barnes, 2003). Debido a lo anterior, es importante considerar este parámetro como una variable de respuesta ante el estrés, aunado a que su cuantificación es relativamente sencilla, rápida y económica.

Existen estudios como los de Klekowski *et al.* (1994b) y Corredor *et al.* (1990) en los cuales se ha tratado de utilizar a los mangles como indicadores del nivel de contaminación por petróleo; sin embargo, el desarrollo de este tipo de investigaciones no ha mostrado continuidad. No fue posible localizar estudios realizados en México referentes al tema, sobre todo con relación al contenido de

clorofila asociado a la contaminación por hidrocarburos. De aquí la importancia del presente estudio.

4.3 Indicadores ambientales

Las evaluaciones de riesgo ambiental (ERA) son una herramienta de suma importancia en la Ingeniería Ambiental, ya que por medio de ellas es posible determinar las concentraciones en los medios (suelo, agua, aire) para las cuales puede esperarse un riesgo aceptable. Concentraciones por arriba de los valores de riesgo aceptable hacen necesaria la aplicación de acciones de remediación u otras medidas alternativas encaminadas al manejo del riesgo a través de la disminución de la biodisponibilidad o la exposición de los organismos. La ERA, tal como la define la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos de México (LGPGIR) y su reglamento (DOF, 2006; 2007), considera como receptores tanto a los seres humanos como a los elementos bióticos de los ecosistemas, a diferencia de la literatura internacional, donde se identifica como evaluación de riesgo a la salud humana (ERSH) a las evaluaciones cuyos receptores son los seres humanos, y como evaluación de riesgo ecológico (ERE) al estudio donde los receptores son los organismos no humanos, principalmente la flora y la fauna (Graham *et al.*, 1991; Wayne *et al.*, 2003).

En este sentido, la ERE es la herramienta más apropiada dentro de la Ingeniería Ambiental para establecer la necesidad de la aplicación de medidas de remediación o mitigación con el fin de proteger los elementos bióticos de un ecosistema. Debido a que en muchas ocasiones no es posible establecer este tipo de riesgos de manera cuantitativa por medio de la obtención de probabilidades o cocientes, tal como se realiza generalmente en las ERSH, es común expresar el riesgo de manera cualitativa o recurrir al uso de indicadores ambientales para su estimación (Hunsaker y Carpenter, 1990).

En este trabajo se plantea evaluar el uso potencial de la concentración de clorofila en la especie de mangle seleccionada, como un indicador ambiental que pueda aplicarse dentro de las ERE.

Los indicadores ambientales se definen como organismos, funciones o características que constituyen un sistema de señales claras y oportunas sobre un determinado proceso ambiental (Quiroga, 2007). En función de sus características

han sido definidas varias categorías de indicadores; algunas de éstas son: de respuesta, de exposición y de hábitat (Hunsaker y Carpenter, 1990).

Los indicadores de respuesta (también denominados de estrés) son características cuantificables del ambiente en cuestión, que proveen evidencias de la condición biológica del recurso, pueden ser a nivel individuo, población, comunidad o ecosistema. Los indicadores de exposición funcionan como herramientas de diagnóstico, generalmente son cuantificados de forma conjunta con los indicadores de respuesta. Por otro lado, los indicadores de hábitat caracterizan atributos físicos con el fin de establecer si las condiciones presentes en el sistema son las necesarias para mantener a un organismo, población o comunidad (Hunsaker y Carpenter, 1990).

En función de los objetivos de cada estudio, es necesario establecer el tipo de indicador que se desea monitorear. Los criterios de selección de especies utilizadas para el monitoreo ambiental son variables, pero en general se recomienda la selección de especies consideradas como críticas, que son aquellas especies vegetales o animales que presenten funciones importantes en la dinámica del ecosistema o que tengan importancia (económica, cultural o científica, entre otras) y que pudieran presentar una mayor vulnerabilidad por la contaminación del sitio. Esta metodología se basa en el principio de que al proteger a las especies críticas se protegerá al resto del ecosistema (Torres *et al.*, 2005).

En el caso de ecosistemas que presentan alteraciones de origen antrópico, la utilización de parámetros indicadores es una herramienta necesaria para determinar el estado de éstos así como las estrategias adecuadas para su remediación en caso de requerirse (Olguín *et al.*, 2007); para esto, la elección del parámetro indicador adecuado es uno de los pasos más importantes. Los indicadores deben reflejar en su comportamiento el efecto de la perturbación estudiada; autores como Evans *et al.* (2003) señalan que los productores primarios son los elementos a los que se les debe dar prioridad al ser la base de la cadena trófica y por ende de la productividad del ecosistema.

Para esto, el uso de la clorofila como parámetro indicador de estrés de los ecosistemas de manglar bajo alteraciones de origen antrópico ha sido documentado anteriormente con buenos resultados por algunos autores (Duke y

Watkinson, 2002; Klekowski *et al.*, 1994a), permitiendo determinar la existencia de efectos a largo plazo que pueden ser considerados irreversibles en escalas de tiempo humano (NOAA, 2010). En este mismo sentido, la eficiencia fotosintética también ha sido utilizada con éxito como medio para establecer si un organismo vegetal se encuentra sometido a estrés, por elementos bióticos y/o abióticos (Calantzis *et al.*, 2000, Clark *et al.*, 2000). Este atributo se estima con base en la fluorescencia de la clorofila *a* y algunos de los parámetros derivados de su medición son ampliamente aceptados como indicadores de estrés de los organismos vegetales (Hansatech, 2006; Strasser *et al.*, 2000).

Otra de las características importantes que deben de ser consideradas para la elección adecuada de un indicador es que sea fácilmente medible (Torres *et al.*, 2005). La utilización de aparatos que faciliten la obtención y manejo de datos ha representado grandes beneficios para el desarrollo económico y científico.

Con base en lo anterior, la evaluación de los resultados obtenidos por el uso de los medidores portátiles respecto a la técnica tradicional de extracción de pigmentos fotosintéticos con acetona (Mackinney, 1941) y su correlación con el contenido de hidrocarburos en el suelo, significaría hacer más eficiente el uso de la clorofila como un indicador de estrés de uso común para las evaluaciones de riesgo ecológico, al permitir la simplificación del método de obtención de los datos, así como la eliminación del uso de sustancias tóxicas y por ende la generación de residuos peligrosos.

4.3.1 Índice de Contenido de Clorofila (ICC)

Se define como el valor relativo de clorofila. La estimación de dicho índice se basa en la absorbancia de la muestra foliar en dos diferentes longitudes de onda (931 nm y 653 nm). Por medio de ambas longitudes de onda es posible realizar la cuantificación de la absorbancia de la clorofila así como efectuar de forma automática las correcciones necesarias producidas por factores mecánicos tales como el grosor de las hojas (Opti-Sciences CCM-200, 2009; Richardson *et al.*, 2002).

La practicidad del aparato, así como su fácil operación, ha permitido su uso ampliamente aceptado en el campo de la agricultura (Richardson *et al.*, 2002). En este sentido, la estimación rápida y no destructiva de la clorofila foliar ha representado una herramienta importante para optimizar su producción ya que se

han ahorrado recursos (tiempo y dinero); esto ha sido posible debido a que se han obtenido correlaciones adecuadas entre los valores de clorofila total extraída por los métodos tradicionales y los valores obtenidos por los medidores portátiles de clorofila expresados por medio del índice de contenido de clorofila (ICC). En el caso de los cultivos agrícolas en los que se ha usado este tipo de equipos, la correlación de este índice con los contenidos de nitrógeno en la planta ha permitido gestionar la aplicación de fertilizantes de manera efectiva (Haripriya y Byju, 2008; Van Den Berg y Perkins, 2004). La documentación de estas relaciones se ha basado en cultivos como maíz, arroz, tomate, col, algodón, chicharo y diferentes árboles frutales, principalmente (Van Den Berg y Perkins, 2004).

La utilidad de los aparatos medidores de clorofila en especies arbóreas de ecosistemas naturales solo ha sido parcialmente estudiada, sobresaliendo las correlaciones significativas entre ICC y la clorofila total reportadas en varias especies de árboles de interés comercial tales como manzana (*Malus domestica* Borkh) y varias especies de árboles de maple; sin embargo, también se ha destacado que las relaciones matemáticas entre el ICC y la clorofila total varía para cada especie así como dependiendo de las etapas de crecimiento y condiciones ambientales (Van Den Berg y Perkins, 2004). Debido a lo anterior, las relaciones entre ambos valores deben ser evaluadas para cada una de las especies de interés (Richardson *et al.*, 2002).

4.3.2 Fluorescencia de la clorofila *a*

De forma general, ésta se refiere a la eficiencia con la cual los electrones son empleados durante el proceso de la fotosíntesis en función de la cantidad de luz absorbida (Krause y Weis, 1991; Sanclemente y Peña, 2008).

En cualquier muestra foliar, cuando la energía de la luz solar es absorbida por la clorofila, su configuración electrónica es alterada de forma temporal utilizando dicha energía para realizar varios procesos, entre ellos el fotosintético. Se sabe que cualquier tipo de estrés, ya sea biótico o abiótico, puede repercutir en la eficiencia en que este proceso se realiza, permitiendo mediante esta medición determinar si la planta está siendo sometida a algún tipo de perturbación (Hansatech, 2006).

Es mediante ciertos parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* que es posible evaluar dicho estrés, estos valores parten de la curva típica generada por la

excitación de los electrones por una intensidad lumínica controlada. En la Figura 4.2 se muestran los parámetros generales evaluados por la fluorescencia de la clorofila *a* a partir de la curva antes mencionada. En esta figura F_0 representa la emisión de energía producida por las moléculas de clorofila *a* excitadas en la estructura de la antena del fotosistema II, F_m es la fluorescencia máxima obtenida a partir de la exposición de la muestra a una intensidad de luz constante, F_v representa el componente variable de la medición (fluorescencia variable) y su valor se correlaciona con la máxima capacidad fotoquímica (este valor se obtiene al restar F_0 a F_m), T_{fm} indica el tiempo en el cual se alcanza la fluorescencia máxima (F_m) y el área sobre la curva de la fluorescencia es proporcional al tamaño de electrones receptores del fotosistema II (Hansatech, 2006; Strasser *et al.*, 2000).

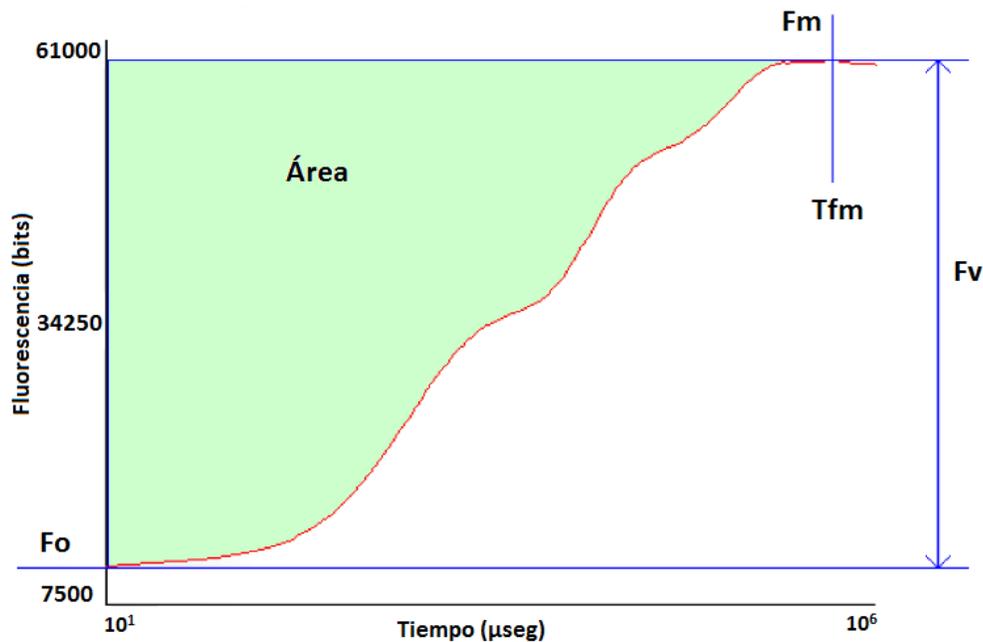


Figura 4.2 Parámetros generales evaluados por la fluorescencia de la clorofila *a*. Modificado de Hansatech.(2006). F_0 = Energía producida por las moléculas excitadas de clorofila *a*, F_m = Fluorescencia máxima, F_v = Fluorescencia variable, T_{fm} = Tiempo en que se alcanza la fluorescencia máxima, Área = área sobre la curva.

De forma general, el parámetro obtenido del cociente F_v/F_m se emplea como indicador del desempeño fotosintético del organismo vegetal (Hansatech, 2006) y se define como la eficiencia cuántica real del fotosistema II (Sanclemente y Peña, 2008).

Este parámetro se mide por medio de equipos especiales como el denominado fluorímetro de clorofila Pocket PEA que fue usado en el presente trabajo. Este equipo funciona registrando el espectro de emisión que produce una muestra foliar como respuesta ante la exposición a una intensidad lumínica controlada por el fluorímetro (Hansatech, 2006).

Otra variable que puede ser utilizada como referente del estrés al que se encuentra sometida una planta es el índice de desempeño (PI por sus siglas en inglés), el cual se define como un indicador de vitalidad (Hansatech, 2006), que en su cálculo combina tanto criterios estructurales como funcionales del fotosistema II (González *et al.*, 2008), su cálculo se realiza a partir de la ecuación 4.1:

$$PI = [ABS / RC] \cdot [\varphi_0 / (1 - \varphi_0)] \cdot [\psi_0 / (1 - \varphi_0)] \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Donde:

PI = Índice de desempeño (Adimensional)

ABS / RC = Absorción de la intensidad lumínica (Adimensional)

φ_0 = Producto cuántico máximo de la fotoquímica primara
 (Adimensional)

ψ_0 = Eficiencia con la que se puede mover un electrón
 después de haber sido captado por el aceptor de electrones
 (Adimensional)

Debido a lo anterior, en el campo de la investigación la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*, al igual que el contenido de clorofila, ha sido evaluada y ampliamente aceptada como un indicador del estrés en sistemas naturales, siendo utilizada como un método no destructivo para el monitoreo de los procesos fotosintéticos y para la evaluación del estado fisiológico de la planta (Krause y Weis, 1991; Strasser *et al.*, 2000), permitiendo la valoración de la tolerancia de la vegetación a condiciones medioambientales específicas, la cual puede ser por causas naturales o inducidas por la actividad humana, observándose valores menores en organismos expuestos a estrés biótico o abiótico, esto principalmente utilizando el parámetro de Fv/Fm (Hansatech, 2006).

5. ZONA DE ESTUDIO

Por razones de confidencialidad, los datos sobre la localización, características específicas y nombre exacto de la zona de estudio no pueden ser mencionados en el presente trabajo de tesis.

La laguna donde se ubica el ecosistema de manglar estudiado se localiza al norte del estado de Veracruz. Las entradas de agua dulce provienen principalmente de tres ríos, un arroyo y un estero. En el área se reporta una precipitación media anual de 1 735 mm/año y una evaporación de 1 300 mm/año (Contreras, 1985).

Es reconocida su amplia biodiversidad, contando con registros de más de 100 especies de peces, un número considerable de moluscos y crustáceos, entre otros, así como ser un hábitat reconocido como sitio de descanso y reproducción de varias especies de aves migratorias.

5.1 Factores bióticos y abióticos

El 54% del área de estudio se encuentra ocupada por actividades de aprovechamiento de tipo agrícola, pecuario y forestal.

El ecosistema natural con mayor cobertura en el área de influencia del evento de contaminación es el manglar, seguido de manchones de encinar, selva mediana subperennifolia, duna costera y pastizal. En estos ecosistemas se reporta un total de 440 especies de flora correspondientes a 303 géneros y 92 familias; entre estas y de acuerdo con resultados del cálculo de la importancia relativa, se identificaron como especies vegetales importantes a *Avicennia germinans* (mangle negro) y *Quercus crassifolia* (encino).

A pesar de que, en general, el área presenta una fragmentación alta, ésta funciona como corredor biológico de especies cuyo hábitat dominante son los manglares.

El clima corresponde predominantemente a la clasificación Am(f), siendo cálido húmedo con una temperatura media anual mayor a los 22 °C. Presenta una marcada estacionalidad, oscilando de los 0 a 60 mm de lluvia en época de estiaje

hasta alcanzar valores mayores a 1 000 mm durante la temporada de lluvia (Contreras, 1985).

El suelo se caracteriza por tener como condicionante principal al vertisol de tipo éutrico (VRe), compuesto por aproximadamente 30% de arcillas hasta 50 cm de profundidad.

5.2 Problemática ambiental

En general, se reconoce que el mayor problema ambiental que presentan los ecosistemas costeros del estado de Veracruz son los cambios en el uso del suelo, el aumento de la población, el uso no controlado de agroquímicos y los desechos de industrias, principalmente la petrolera (Contreras, 1985).

De forma particular, el área de estudio corresponde a un sitio donde a principios del siglo XX ocurrió un evento que dio lugar al derrame de petróleo crudo, el cual con el tiempo fue controlado casi en su totalidad; en la actualidad se tienen únicamente emanaciones esporádicas de crudo con poco alcance. Los estudios realizados en el año 2007 por el Instituto de Ingeniería de la UNAM reportaron concentraciones de hidrocarburos en los primeros veinte centímetros de suelo que van de aproximadamente 300 mg·kg⁻¹ para los hidrocarburos de fracción ligera, 4 000 mg·kg⁻¹ para la fracción media y por arriba de 100 000 mg·kg⁻¹ en el caso de la fracción pesada.

El área total estudiada en el proyecto antes mencionado ocupa un total de 925 hectáreas, donde fue determinado que la superficie presumiblemente contaminada es de 355 hectáreas. La mayor parte del terreno que se encuentra contaminado es inundable, y su cobertura del suelo es vegetación silvestre (Figura 5.1).



Figura 5.1 Zona de estudio.

6. METODOLOGÍA

El objetivo principal de la investigación fue establecer la relación entre la concentración de clorofila en el tejido foliar de la especie *A. germinans* (variable de respuesta) y la concentración de hidrocarburos fracción pesada en el suelo (HFP, variable independiente). Para ello se consideraron dos tratamientos: Sitio Testigo y Sitio Contaminado; el primero presenta poca perturbación antropogénica, tanto en lo que a concentración de hidrocarburos se refiere como a asentamientos humanos, mientras que el Sitio Contaminado es una de las áreas con mayor impacto por la contaminación de HFP. Además, dichos resultados proveerán bases para evaluar la utilidad del contenido de clorofila como un indicador ambiental.

Se trata de un experimento natural (también conocido como estudio observacional). Este tipo de experimentos se caracterizan por realizarse en campo y por lo tanto no tener control sobre los factores cuantificados, sino que éstos se encuentran bajo la variabilidad natural a la que están sometidos los ecosistemas (Gotelli y Ellison, 2004). Debido a lo anterior, no es posible realizar un diseño de experimentos y se propuso obtener correlaciones estadísticas entre la variable de respuesta (concentración de clorofila) y la variable independiente de interés (HFP). Además de esta variable independiente se vio la necesidad de considerar otras que también pudieran tener un efecto en la variable de respuesta por estar identificadas en la literatura internacional como factores limitantes en el desarrollo de la especie en cuestión (nutrimentos, salinidad y pH, ver Tabla 6.1).

Asimismo, se cuantificaron otras variables de respuesta en los individuos de *A. germinans* que se considera pueden verse afectadas por las fuentes de estrés: eficiencia fotosintética, biomasa y superficie foliar de acuerdo con los métodos señalados en la Tabla 6.1; estos parámetros también se correlacionaron con la concentración de HFP en el suelo y las otras variables independientes mencionadas. En la Figura 6.1 se muestra el diagrama metodológico.

Tabla 6.1 Variables cuantificadas y métodos utilizados.

No.	Variable	Método	Referencia	Matriz
1	pH ⁽¹⁾	Potenciométrico	NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002)	
2	Nitrógeno total ⁽¹⁾	Kjeldahl	NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002)	Suelo ⁽³⁾
3	Hidrocarburos fracción pesada (HFP) ⁽¹⁾	Extracción por Microondas	EPA 9071B y EPA 4664A (EPA, 1998; 2000)	
4	Salinidad ⁽¹⁾	Conductividad eléctrica	Evans <i>et al.</i> (2003)	
5	Fósforo aprovechable ⁽¹⁾	Colorimetría	NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002)	
6	Concentración de clorofila ⁽¹⁾	Extracción con acetona al 80%	Rodés y Collazo (2006)	
7	Índice de contenido de clorofila ⁽¹⁾	Espectrofotometría (CCM-200)	Opti Sciences CCM 200 (2009)	Tejido Foliar
8	Eficiencia fotosintética ⁽²⁾	Fluorescencia (Pocket PEA)	Hansatech (2006)	
9	Biomasa foliar ⁽²⁾	Gravimetría	Steubing <i>et al.</i> (2002)	
10	Superficie foliar ⁽²⁾	Gravimetría	Steubing <i>et al.</i> (2002)	
11	Diámetro a la altura del pecho (DAP) ⁽¹⁾	Cinta métrica	Barreiro y Signoret (1999)	Individuos de <i>A. germinans</i>
12	Altura total ⁽¹⁾	Clinómetro	No aplica	

⁽¹⁾ Determinados en la primera campaña de muestreo. ⁽²⁾ Determinados en la segunda campaña de muestreo. ⁽³⁾ Para la determinación de estos parámetros se tomó una muestra de suelo de 1 kg del área radicular de cada individuo de mangle seleccionado.

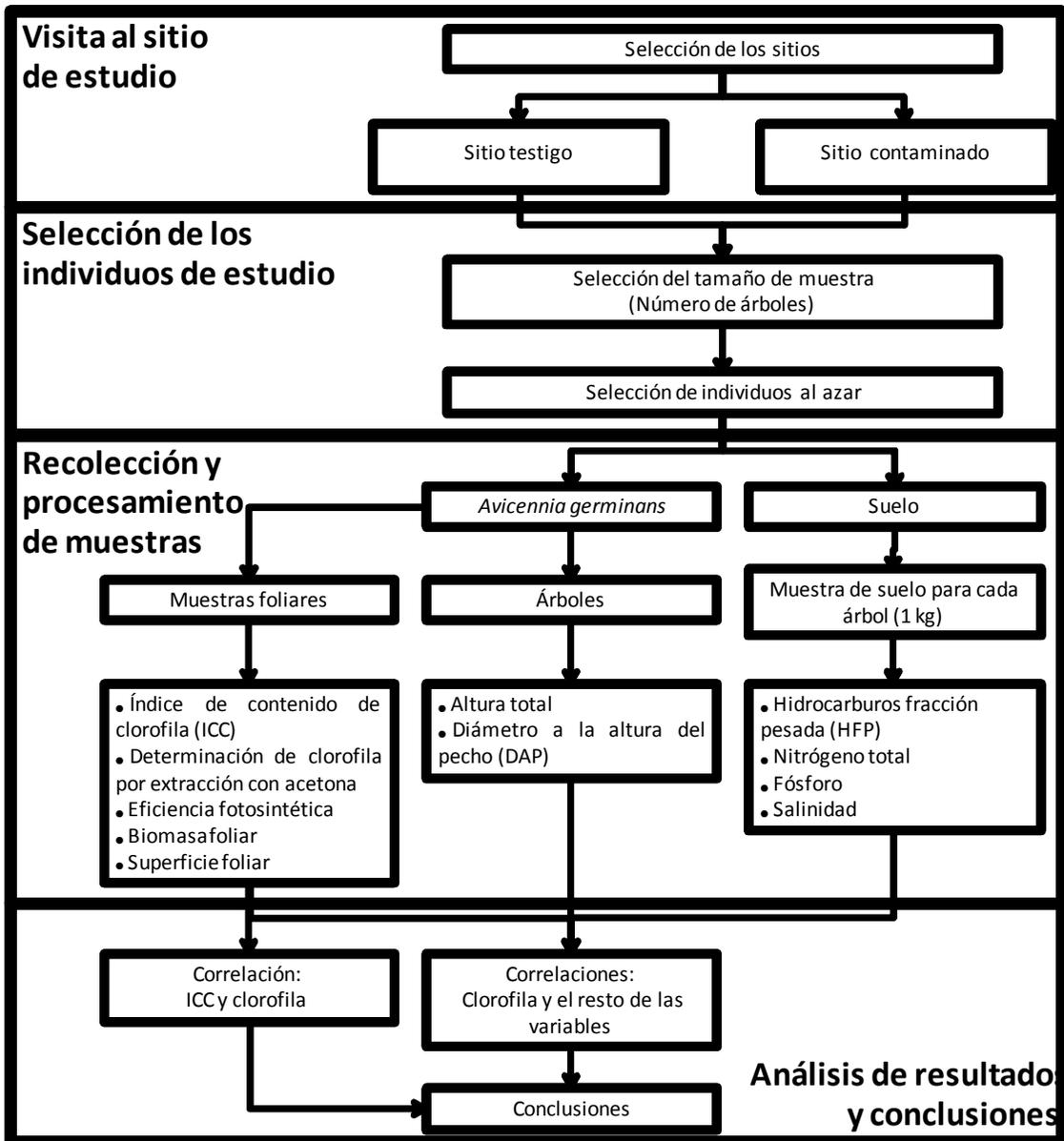


Figura 6.1 Diagrama metodológico.

Se realizaron dos campañas de muestreo: la primera del 26 de marzo al 3 de abril y la segunda del 14 al 19 de noviembre, ambas en el año 2011. Todos los datos obtenidos durante ambas campañas de muestreo se registraron en la hoja de campo que se indica para cada parámetro, localizadas en el Anexo 1. En la primera campaña se midió el contenido de clorofila en las hojas de los árboles de mangle seleccionados para el estudio (ICC y concentración de clorofila con el método destructivo con acetona al 80%; hojas de campo 3 y 4 respectivamente) y los parámetros estructurales de los árboles (diámetro a la altura del pecho y altura; hoja de campo número 2); también se tomaron las muestras de suelo para la determinación de HFP, nitrógeno total, fósforo aprovechable, salinidad y pH. En la segunda campaña se cuantificó la eficiencia fotosintética de los árboles de mangle seleccionados en la primera campaña (hoja de campo número 6) y se determinaron la biomasa y superficie foliar (hoja de campo número 8) de acuerdo con los métodos señalados en la Tabla 6.1.

Se establecieron unidades experimentales diferentes: para la correlación de los dos métodos de cuantificación del contenido de clorofila (método destructivo de extracción con solución de acetona y método no destructivo por un medidor portátil), la unidad experimental fue cada hoja muestreada (10 hojas por árbol), teniendo un total de 300 muestras por sitio. Para la correlación de la concentración de HFP presentes en el suelo con la concentración de clorofila (evaluado por los dos métodos antes mencionados) y la eficiencia fotosintética, la unidad experimental fue cada árbol de mangle estudiado (30 árboles por sitio).

Del mismo modo, el análisis de la relación de los efectos de los HFP sobre el resto de los parámetros cuantificados se determinó considerando a los individuos de *A. germinans* como la unidad experimental.

Por otra parte, es importante mencionar que para la correlación existente entre las lecturas del ICC con el medidor portátil Opti-Sciences CCM-200 y la concentración de clorofila medida por la extracción con acetona, se consideró que una correlación positiva superior a 0.9 indicaría que los dos métodos tienen una buena relación por lo que sería posible en el futuro usar el medidor portátil para estimar la concentración de clorofila en la especie que se esté estudiando (Anand y Byju, 2008; Cassol *et al.*, 2008; Marenco *et al.*, 2009; Uddling *et al.*, 2007). Es decir, con

una buena correlación como la mencionada anteriormente, podría obtenerse una curva de calibración que relacionaría el ICC en el eje de las abscisas y la concentración de clorofila en el de las ordenadas, de manera que podría interpolarse la concentración de clorofila para un ICC determinado.

Mediante el mismo análisis se estudió la relación del valor obtenido por el uso del medidor portátil respecto a otros pigmentos fotosintéticos (clorofila *b* y carotenoides). Como ya se mencionó, para establecer la relación antes mencionada, la unidad experimental utilizada fue cada hoja analizada de *A. germinans*.

Es importante señalar que, en el caso del análisis de las correlaciones entre el contenido de clorofila en el mangle y la concentración de HFP en el suelo, se usó el valor promedio de concentración de clorofila $a + b$ obtenido por el método tradicional (extracción con acetona), esto por ser la metodología de cuantificación de clorofila utilizada de forma regular internacionalmente. El ICC solo se usó para evaluar la correlación de los métodos.

Adicionalmente, se realizaron comparaciones estadísticas de las concentraciones de clorofila (clorofila $a+b$, método destructivo), la eficiencia fotosintética, biomasa y superficie foliar de los árboles de mangle de cada sitio de estudio. Las mismas pruebas se aplicaron a las variables independientes: concentraciones de HFP, N, P y salinidad, así como pH. Esto es con el objetivo de establecer si existían diferencias estadísticas significativas entre las variables cuantificadas en ambos sitios.

En las secciones siguientes se describen los métodos de análisis y los procedimientos seguidos en los pasos señalados en el diagrama metodológico (Figura 6.1).

6.1 Tamaño de la muestra y procedimiento de muestreo

6.1.1 Individuos de mangle

El tamaño de la muestra se estableció en 30 individuos de la especie de estudio por sitio. Este número se determinó con base en el valor de la varianza, donde el tamaño adecuado es aquel para el cual no se tienen diferencias significativas en este estadístico independientemente del incremento del número de individuos

analizados, además de ser un tamaño de muestra superior al recomendado para trabajos de campo, siendo considerado como suficiente para reflejar patrones de comportamiento de las variables estudiadas (Glass, 2006; Gotelli y Ellison, 2004; Kathiresan, 2005).

En cada sitio se estableció una parcela de aproximadamente 10 x 100 metros paralela al gradiente ambiental (Cintrón y Schaeffer, 1983). La ubicación de las parcelas se hizo en función de los resultados de concentración obtenidos en el estudio del año 2007, así como de los resultados obtenidos en un muestreo realizado en abril de 2010, durante una visita de reconocimiento del sitio.

La selección de los individuos dentro de cada parcela se hizo en función de su disponibilidad, siguiendo el criterio estructural de un diámetro a la altura del pecho (DAP) mínimo de 2.5 cm, ya que este es el diámetro mínimo para que un individuo de mangle sea considerado como árbol y no como plántula (Barreiro y Signoret, 1999). Una vez elegidos los organismos de *A. germinans* que integrarían la muestra de cada sitio, se realizó la caracterización física de cada uno de ellos por medio del registro del DAP y la altura total (Tabla 6.1), las cuales corresponden a los atributos generales del individuo, cabe señalar que el DAP se define como el diámetro del tronco del árbol aproximadamente a 130 cm de altura.

6.1.2 Muestras foliares

En ambas campañas de muestreo se colectaron 10 hojas por árbol, dicho número fue elegido en función de lo recomendado para el estudio de sistemas naturales, al ser suficiente para observar patrones en el comportamiento de la variable, así como tener el suficiente poder estadístico que respalde dicho comportamiento (Gotelli y Ellison, 2004).

En ambas campañas de campo, las muestras seleccionadas se eligieron con base en la estratificación del individuo de *A. germinans* en función de su altura, exposición al sol, edad de las hojas, presencia mínima o nula de daños por herbívoros o cualquier otro tipo de deterioro o deformidad; lo anterior con el propósito de obtener muestras representativas de cada individuo.

En general se consideraron 3 estratos: alto, medio y bajo, de acuerdo con la posición de la rama seleccionada respecto a la altura del árbol. Las ramas se

colectaron por medio de una tijera telescópica, y de cada rama se seleccionaron 3 o 4 hojas para su análisis, hasta completar 10 de cada árbol.

Durante la primera campaña de muestreo, las hojas seleccionadas se marcaron con cinta de plástico y en ellas se midió el ICC con el medidor Opti-Sciences CCM-200, tomándose lecturas por duplicado. Cada hoja fue identificada con un número del 1 al 10 para llevar el control de las lecturas obtenidas del ICC con el medidor portátil (Figura 6.2), permitiendo su posterior identificación para la cuantificación de la concentración de clorofila por medio del método destructivo por extracción con solución de acetona al 80%. Para cada hoja se tomaron los datos que se indican en la hoja de campo número 3 (Anexo 1).



Figura 6.2 Proceso de colecta y marcado de las hojas de mangle. a) Colecta con tijeras telescópicas. b) Determinación de ICC con el equipo portátil Opti-Sciences CCM-200. c) Marcado de hojas con cinta de plástico.

Una vez medido el ICC, las ramas se envolvieron en bolsas de plástico negro para prevenir degradación por efecto de la luz de los pigmentos fotosintéticos y se preservaron en una hielera hasta el momento de su análisis para determinar las clorofilas por el método destructivo (extracción con solución de acetona al 80%).

El muestreo de hojas y la determinación del ICC se realizaron de las 8:00 a las 12:00 h, procesándose entre 12 y 15 árboles diariamente. El procesamiento de las muestras foliares por el método de extracción de pigmentos con acetona al 80% se realizó de las 13:00 a las 20:00 h. del mismo día en que fueron colectadas.

Por otra parte, se registró la intensidad lumínica durante el proceso de muestreo en intervalos de 15 minutos con un radiómetro marca LI-COR con el objetivo de reunir la mayor información posible respecto a las condiciones ambientales durante el proceso de toma de muestras.

En el caso de la segunda campaña de muestreo, las muestras seleccionadas se analizaron en campo para el registro de la eficiencia fotosintética, la cual se cuantificó con un fluorímetro marca Hansatech, modelo Pocket PEA, previa adaptación a la oscuridad por 15 minutos. El tiempo de adaptación fue establecido de acuerdo con la metodología recomendada en el manual del fluorímetro (Hansatech, 2006), la cual consiste en someter varias muestras de la especie en cuestión a diferentes periodos de tiempo de adaptación a la oscuridad, incrementando el tiempo transcurrido hasta obtener el valor máximo de eficiencia fotosintética (F_v/F_m).

La determinación de la eficiencia fotosintética se basa en la medición de la fluorescencia de la clorofila a de los organismos vegetales. El equipo Pocket Pea emplea pinzas especialmente diseñadas para adaptar la superficie foliar analizada a condiciones de oscuridad (Figura 6.3a). Posterior al periodo de adaptación a la oscuridad, el fluorímetro registra la fluorescencia resultante de someter la muestra en cuestión a un haz de luz de $3\ 500\ \mu\text{mols m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ a una longitud de onda de 627 nm (Figura 6.3b).

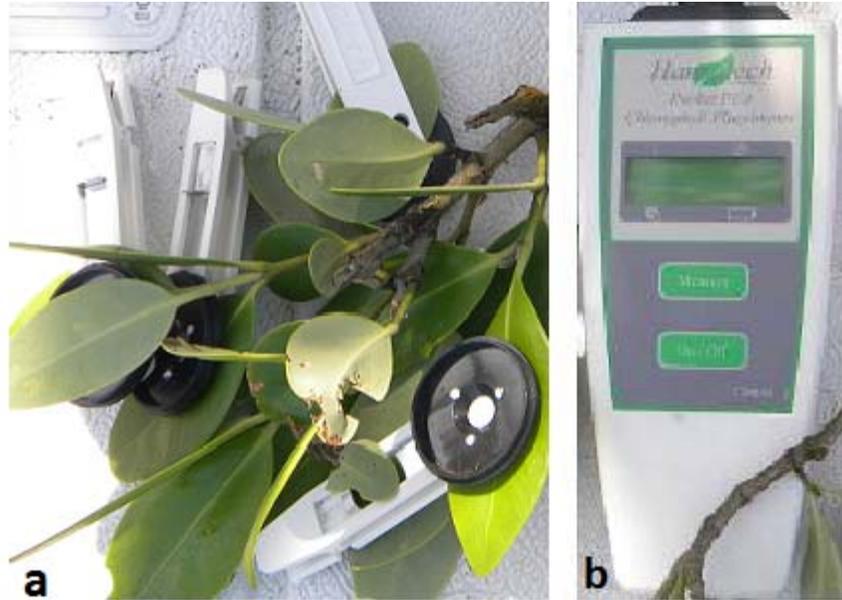


Figura 6.3 Determinación de la eficiencia fotosintética con el equipo Pocket PEA de Hansatech. a) Pinzas para la adaptación a la oscuridad colocadas en las muestras foliares. b) Fluorímetro Pocket Pea utilizado para la cuantificación de la fluorescencia de la clorofila *a*.

Posterior a la cuantificación de la fluorescencia de la clorofila, las muestras se almacenaron en bolsas plásticas, se etiquetaron y se transportaron en una hielera para la determinación de la biomasa y la superficie foliar.

6.1.3 Muestras de suelo

En la primera campaña de muestreo, de manera simultánea a la colecta de hojas de los árboles de mangle, se tomaron muestras de suelo del área inmediata a la base de cada individuo de *A. germinans* para determinar los parámetros señalados en la Tabla 6.1. Se colectó 1 kg de muestra de suelo por individuo de mangle considerado. Las muestras de suelo se tomaron con un muestreador tipo Auger. Se geoposicionaron dichos puntos con un GPS marca Garmin Etrex. Las muestras se identificaron con la misma clave utilizada para el individuo de *A. germinans* al cual representaban; se empacaron en bolsas de plástico y se preservaron con hielo hasta su llegada al laboratorio del Instituto de Ingeniería.

A cada muestra de suelo se le midió pH y salinidad, y 200 g de suelo se enviaron al Laboratorio Central de la Universidad Autónoma Chapingo para la cuantificación de fósforo aprovechable y nitrógeno total por los métodos indicados en la Tabla 6.1. El

resto de las muestras de suelo se mantuvieron a 4°C en el cuarto frío del Laboratorio de Ingeniería Ambiental antes mencionado para la cuantificación de HFP y conductividad eléctrica, esta última para la determinación de salinidad.

Los resultados obtenidos de los análisis de nutrimentos y salinidad de las muestras del suelo se usaron para hacer las correlaciones con las concentraciones de hidrocarburos medidas en el suelo (HFP) y el contenido de clorofila de los individuos de mangle, así como con los otros parámetros de respuesta evaluados (eficiencia fotosintética y parámetros estructurales).

6.2 Análisis de las muestras foliares

6.2.1 Determinación de clorofila por el método destructivo

Como ya se explicó, las correlaciones del contenido de clorofila en las hojas de mangle vs. la concentración de HFP en las muestras de suelo se realizó empleando los valores de concentración de clorofila obtenidos por el método destructivo (promedio de las 10 hojas analizadas de cada individuo). Estos resultados a su vez se emplearon para la comparación de resultados entre el método destructivo y el no destructivo de cuantificación de la clorofila.

Para la determinación de clorofila por el método destructivo (Figura 6.4) se usó el método de extracción con una solución de acetona al 80% (Rodés y Collazo, 2006) con el siguiente procedimiento:

- 1) Se eliminó la nervadura central a la hoja y posteriormente se registró su peso.
- 2) Se maceró cada hoja de forma individual en un mortero de cerámica, facilitando la molienda con la adición de aproximadamente¹ 15 ml de solución de acetona grado industrial al 80%, media cucharilla de arena grado reactivo (aproximadamente 1 g)² y un cuarto de cucharilla de carbonato de calcio (aproximadamente 1 g)².

¹ Las cantidades adicionadas son aproximadas al tener como propósito el facilitar la molienda de la muestra, así como prevenir la acidificación (en el caso del carbonato de calcio), por lo que no es necesaria la adición exacta de dichos reactivos.

- 3) Una vez finalizada la molienda, el extracto se filtró con papel filtro genérico de poro fino (aproximadamente $2.5 \mu\text{m}$) y se aforó en matraces volumétricos de 50 ml con la solución de acetona al 80% previamente preparada.
- 4) La absorbancia de la solución se cuantificó por duplicado a 440, 645 y 663 nm con el uso de un espectrofotómetro marca HACH, modelo DR 2000.
- 5) Los resultados se registraron en la hoja de campo número 4 (Anexo 1), y dichos datos se utilizaron para el cálculo del contenido de clorofila *a*, *b*, *a + b* y carotenoides en mg l^{-1} (Ecuaciones 6.1 a 6.4).

En la Figura 6.4 se muestra el procedimiento antes descrito.

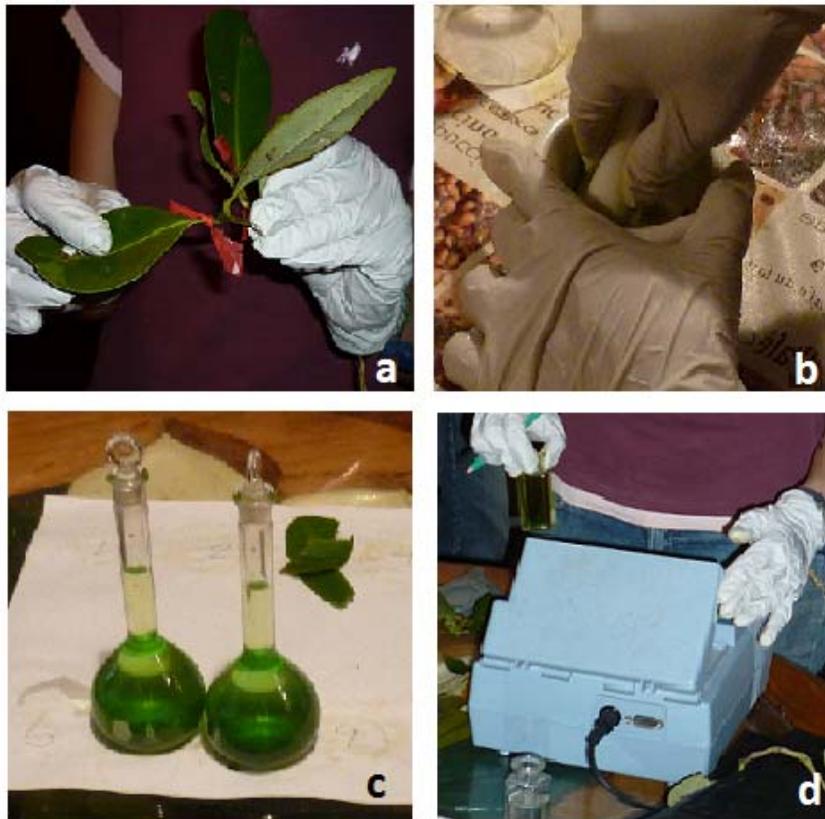


Figura 6.4 Determinación de clorofila por el método de extracción con acetona al 80%. a) Identificación de muestras previamente seleccionadas. b) Molienda de la muestra. c) Aforado de la muestra preparada. d) Cuantificación de la absorbancia.

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (12.7 \cdot \text{Abs}_{663}) - (2.69 \cdot \text{Abs}_{645}) \quad \text{Ecuación 6.1}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (22.9 \cdot \text{Abs}_{645}) - (4.68 \cdot \text{Abs}_{663}) \quad \text{Ecuación 6.2}$$

$$\text{Clorofila } a + b \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (20.2 \cdot \text{Abs}_{645}) + (8.02 \cdot \text{Abs}_{663}) \quad \text{Ecuación 6.3}$$

$$\text{Carotenoides (mg l}^{-1}\text{)} = (4.695 \cdot \text{Abs}_{440}) - (0.268 \cdot \text{Clorofila } a + b) \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde:

Abs_{440} = Absorbancia de la muestra a 440 nm

Abs_{645} = Absorbancia de la muestra a 645 nm

Abs_{663} = Absorbancia de la muestra a 663 nm

6.2.2 Biomasa foliar

Como ya se explicó, posterior a la determinación de la eficiencia fotosintética, las hojas se preservaron para la determinación de la biomasa y la superficie foliar. Estos parámetros se determinaron para verificar si la concentración de HFP tenía un efecto adverso en estas características que son importantes para la vegetación porque, de la misma forma que los parámetros estructurales, denotan si el organismo vegetal está destinando parte de la energía generada a su crecimiento. Ambos parámetros se determinaron por métodos destructivos basados en gravimetría.

En el caso de la estimación de la biomasa, el material foliar recolectado y transportado al laboratorio se colocó en una estufa a 105°C hasta obtener un peso constante (Steubing *et al.*, 2002); dicho peso (peso seco) se comparó con el peso inicial (peso húmedo tomado en campo) para estimar el contenido relativo de agua de las muestras.

7.2.3 Superficie foliar

Para la determinación de la superficie foliar se siguió el siguiente procedimiento (Steubing *et al.*, 2002):

1) Una vez seleccionadas las muestras foliares se trazó su perímetro en hojas de papel bond.

2) El perímetro de las hojas trazado en papel se recortó y relacionó con el peso de un área conocida del mismo papel utilizado.

3) Una vez realizado este procedimiento, los datos registrados se relacionaron con la Ecuación 6.5 para así obtener la superficie de cada hoja recolectada.

$$S = (g' \cdot a) / g$$

Ecuación 6.5

Donde

S = Superficie foliar (m²)

g' = Peso de las hojas de papel recortadas (g)

a = Superficie conocida del papel (m²)

g = Peso del área de papel recortada con peso conocido (g)

Como dato auxiliar para la determinación tanto de la biomasa como de la superficie foliar se realizó el conteo del número aproximado de hojas que posee cada árbol, con lo cual fue posible determinar el número promedio de hojas por árbol por sitio, lo anterior cobra importancia al recordar que el tejido foliar es en donde se realiza el proceso de la fotosíntesis.

Debido a que dicha técnica es subjetiva (Steubing *et al.*, 2002), los resultados obtenidos a partir de ésta no serán analizados estadísticamente y sólo se utilizarán como una aproximación.

6.3 Análisis de las muestras de suelo

6.3.1 Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP)

La cuantificación de HFP en el suelo se realizó por duplicado de acuerdo con la técnica de extracción en horno de microondas y cuantificación gravimétrica (EPA, 1998; 2000) (Tabla 6.1). Se usó un horno de microondas marca MARS con capacidad para 14 muestras. El procedimiento se enuncia a continuación:

- 1) Todas las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron con una malla del número 10 (2 mm).

- 2) Se pesaron 3 g de muestra (por duplicado), los cuales se colocan en vasos de teflón del horno de microondas.
- 3) A cada vaso se adicionaron 30 ml de una mezcla 1:1 de acetona-hexano grado técnico y posteriormente se colocaron en el carrusel portavasos del horno.
- 4) El proceso de extracción por microondas tuvo una duración total de 40 minutos (10 minutos de rampa para alcanzar 110 °C, 10 minutos donde se mantiene dicha temperatura y 20 minutos para el proceso de enfriamiento).
- 5) Las muestras se filtraron por gravedad con filtros Whatman No. 43, en matraces volumétricos con capacidad de 250 ml, previamente acondicionados a peso constante en una estufa (105 °C por 24 horas).
- 6) El filtrado resultante se evaporó a sequedad en un rotavapor marca Laborota, modelo 4011 - digital, a una temperatura de 30 a 35 °C y 100 rpm.
- 7) Los matraces se colocaron nuevamente a peso constante (105 °C por 24 horas). Posteriormente se les agregó sílica gel (la cantidad necesaria se determinó en función del peso del extracto²). La mezcla se diluyó con 70 ml de hexano grado técnico mediante agitación magnética.
- 8) La solución resultante del paso anterior se filtró por gravedad con papel Whatman No. 43 y nuevamente se evaporaron por medio de un rotavapor.
- 9) Una vez evaporada la muestra, los matraces se colocaron en la estufa a 105 °C hasta tener condiciones de peso constante.
- 10) El matraz con la muestra procesada se pesó en una balanza analítica. La cuantificación de los HFP se realizó por la determinación de diferencias de pesos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de acuerdo con la Ecuación 6.6.

² Peso del extracto: de 0 a 100 mg se agregan 3 g de sílica gel, de 101 a 200 mg: 6 g, de 201 a 300 mg: 9 g, de 301 a 400 mg: 12 g y de 401 a 500 mg: 15 g.

$HFP = [P_{M+HC} - P_M] / P_S$	Ecuación 6.6
Donde:	
HFP = Hidrocarburos fracción pesada ($mg \cdot kg^{-1}$)	
P_{M+HC} = Peso del matraz del segundo proceso de filtrado (mg)	Paso 9 y 10
P_M = Peso del matraz limpio a peso constante (mg)	Antes del paso 8
P_S = Peso de la muestra seca utilizada (kg)	Paso 2

6.3.2 Nutrimientos

Para la cuantificación de los nutrientes del suelo (nitrógeno total y fósforo aprovechable), las muestras se llevaron al Laboratorio Central de la Universidad Autónoma Chapingo. Las muestras se preservaron y analizaron como lo indica la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002). En el caso del análisis del fósforo aprovechable, previamente a su envío al laboratorio, se determinó el pH para cada muestra con el propósito de seleccionar el método adecuado de análisis, el cual fue el procedimiento de Olsen, el cual se basa en la extracción del fósforo del suelo por medio de una solución de $NaHCO_3$ 0.5 M ajustada a un pH de 8.5. Respecto a la medición del nitrógeno total, esta se realizó por medio de la digestión de la muestra por calentamiento. Los métodos utilizados se muestran en la Tabla 6.1.

6.3.3 pH

Las determinaciones de pH se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Se determinó el pH medido en agua por el método potenciométrico (Tabla 6.1). Cada muestra se analizó por triplicado. El método de análisis fue el siguiente:

- 1) Todas las muestras se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron con una malla del número 10 (2 mm).

- 2) Se colocaron 10 g de suelo en un vaso de precipitados al cual se adicionaron 20 ml de agua destilada.
- 3) Las muestras se agitaron mecánicamente durante 30 minutos a 120 rpm.
- 4) La mezcla se dejó reposar por 15 minutos.
- 5) Una vez pasado dicho periodo de tiempo, se agitaron las muestras manualmente con el fin de resuspender la muestra y el pH se midió inmediatamente después con un potenciómetro marca Thermo, modelo Orion 4Star, previamente calibrado de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

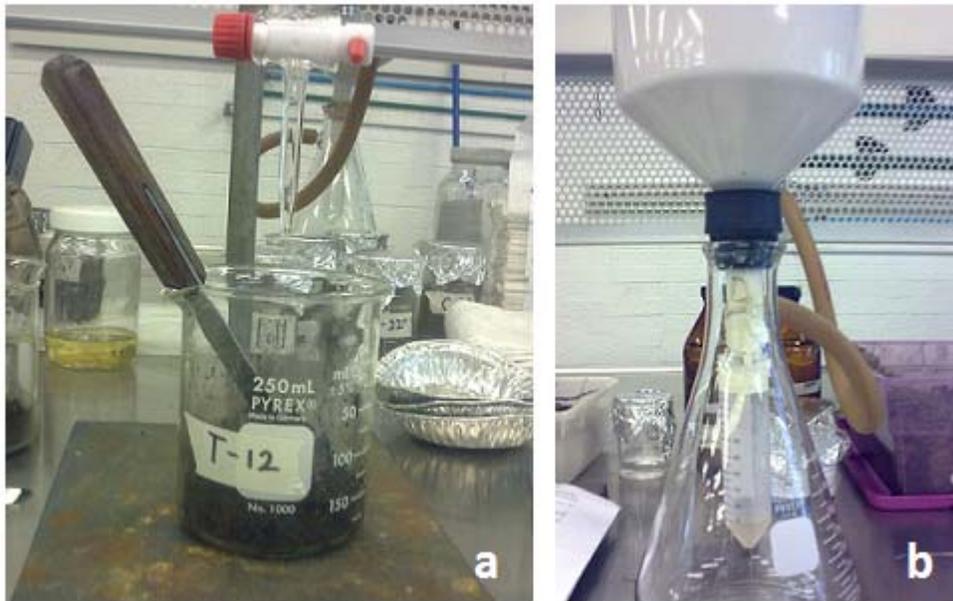
6.3.4 Salinidad

La salinidad se cuantificó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM de acuerdo con la metodología señalada en la Tabla 6.1 (por medio de la conductividad eléctrica) como se describe a continuación (Figura 6.5):

1. Se pesaron 40 g de cada muestra de suelo seco y tamizado (tamiz número 10), los cuales se colocaron en vasos de precipitados. Las muestras se procesaron por triplicado.
2. La muestra se saturó a juicio con agua destilada hasta obtener la pasta de saturación.
3. La saturación de la pasta del suelo se comprobó una hora después de haberse concluido el proceso, verificando que no se presentara agua libre ni sequedad. En caso de ser necesario se añadió una mayor cantidad de suelo o agua destilada según el caso.
4. La pasta del suelo se dejó reposar por un periodo de 24 horas.
5. Una vez cumplido este periodo, la pasta se filtró al vacío con un matraz Kitazato, recolectando el extracto del suelo por medio de la adaptación de un tubo plástico en el interior del matraz y alineado a la boca del embudo.

6. Inmediatamente después de haber obtenido el extracto, se cuantificó la conductividad eléctrica con un conductímetro marca Thermo modelo Orion 4Star previamente calibrado de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

La salinidad fue evaluada mediante los resultados obtenidos de esta muestra utilizando la tabla de clasificación establecida en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002).



*Figura 6.5 Medición de la salinidad por medio de la conductividad eléctrica.
a) Preparación de la pasta de saturación del suelo. b) Filtrado de la pasta de saturación de la muestra de suelo.*

7. RESULTADOS

Se realizaron tres tipos de análisis de los resultados obtenidos. En primer lugar se correlacionaron los resultados obtenidos por los dos métodos empleados para la cuantificación de la clorofila (método destructivo y no destructivo) con la finalidad de evaluar si este último podría ser empleado como un sustituto del primero, con los beneficios de eliminar el uso y generación de sustancias y residuos peligrosos. En caso de obtenerse una alta correlación entre ambos métodos, el ahorro de tiempo y recursos económicos sería considerable.

En segundo lugar se comparó el comportamiento de las variables cuantificadas en los Sitios Testigo (SC) y Contaminado (ST), esto fue con el objetivo de establecer si se presentan diferencias significativas entre ambas localidades; la existencia de éstas entre ambos sitios sería una señal de que la presencia de hidrocarburos en el suelo podría estar afectando a los individuos de la especie estudiada.

Finalmente, se realizaron las correlaciones entre las variables independientes (HFP, nitrógeno total, fósforo aprovechable, salinidad y pH) y las variables de respuesta (clorofila, eficiencia fotosintética y biomasa y superficie foliar). Altas correlaciones entre los parámetros indicarían una alta dependencia entre estos, mientras que bajos coeficientes de correlación denotarían que el comportamiento de un parámetro no tiene influencia sobre la variable de respuesta. Todos los resultados son discutidos y analizados con detalle en el capítulo 8.

7.1 Comparación de dos métodos de cuantificación de clorofila

Los resultados obtenidos por ambos métodos para la cuantificación de clorofila en *A. germinans* se analizaron por medio de correlaciones simples. Mediante dicho estadístico se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.498$ para un tamaño total de muestra de 600 hojas, es decir, considerando en un sólo conjunto las muestras de los SC y ST (Figura 7.1).

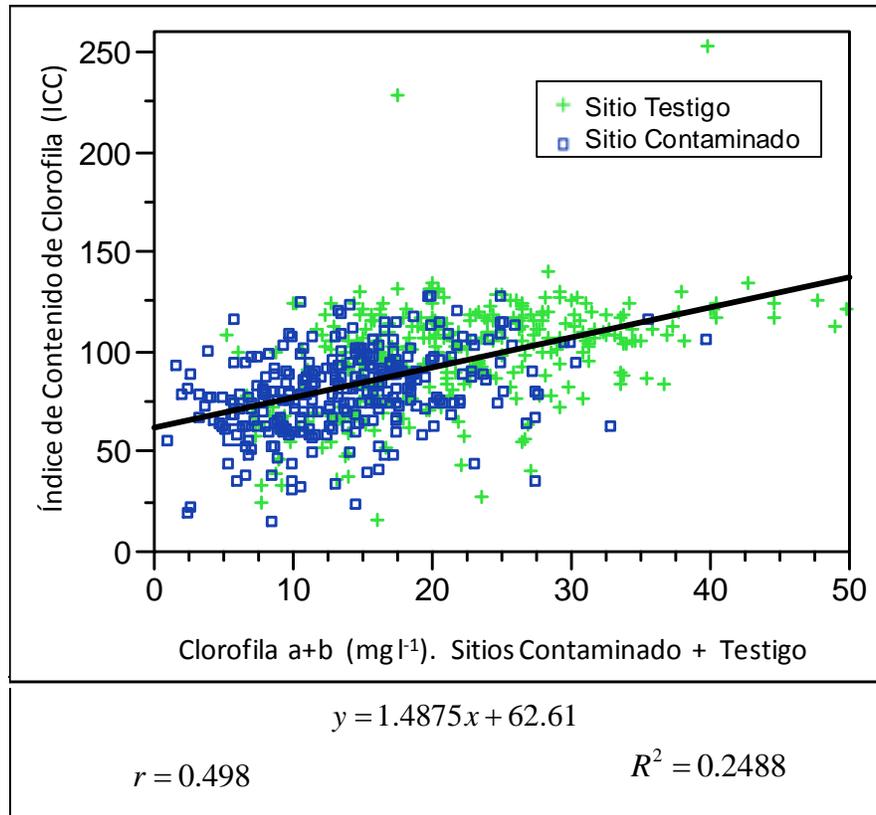


Figura 7.1 Correlación de clorofila a+b (mg l⁻¹) respecto al índice de contenido de clorofila (n = 600, 300 hojas de mangle por sitio). r = Coeficiente de correlación, R² = Coeficiente de determinación, y = Ecuación estimada para el comportamiento del ICC en función de la variable x (clorofila a + b).

La relación de los valores de ICC respecto a la clorofila *a* es similar, aunque ligeramente inferior a la observada respecto a la clorofila *a+b*; mostrando un coeficiente de correlación $r = 0.490$ para un tamaño de muestra total de $n = 600$. En el caso de la clorofila *b* y carotenoides, los coeficientes de correlación fueron menores en comparación con el resto de los pigmentos fotosintéticos, como se puede apreciar en la Tabla 7.1

Tabla 7.1 Coeficientes de correlación (r) del Índice de Contenido de Clorofila respecto a los pigmentos fotosintéticos evaluados.

Sitio	r			
	ICC vs. Clorofila a+b	ICC vs. Clorofila a	ICC vs. Clorofila b	ICC vs. Carotenoides
Sitio Testigo (n = 300)	0.427	0.412	0.391	0.153
Sitio Contaminado (n = 300)	0.356	0.368	0.291	0.348
Sitio Contaminado + Sitio Testigo (n = 600)	0.498	0.490	0.452	0.279

Analizando de manera independiente a cada sitio se obtuvo un valor $r = 0.356$ en el caso del Sitio Contaminado (Figura 7.2a) y una $r = 0.427$ para el Sitio Testigo (Figura 7.2b).

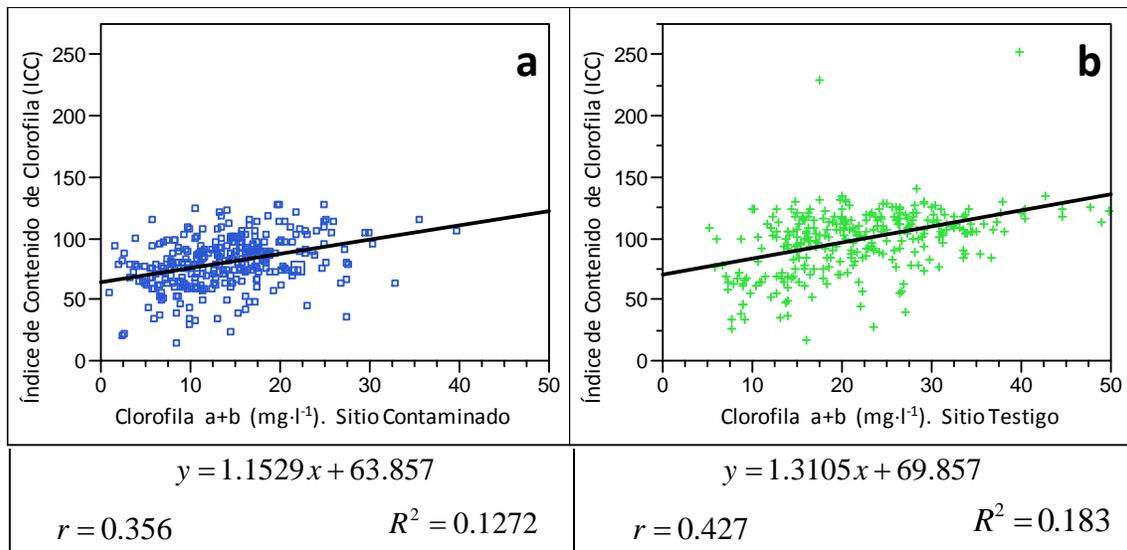


Figura 7.2 Correlación de la clorofila a+b respecto al índice de contenido de clorofila. a) Sitio Contaminado (n= 300). b) Sitio Testigo (n = 300). r = Coeficiente de correlación, R^2 = Coeficiente de determinación, y = Ecuación estimada para el comportamiento del ICC en función de la variable x (clorofila a + b).

Debido a la baja correlación obtenida entre ambos métodos de estimación del contenido de clorofila, a partir de este punto, se utilizaron los valores obtenidos por el método tradicional de extracción de pigmentos fotosintéticos con solución de acetona al 80% en todos los análisis realizados donde se evaluó el comportamiento de la clorofila.

7.2 Comparación estadística de las variables entre sitios

Se realizó la comparación de los parámetros estudiados en el Sitio Contaminado y Sitio Testigo por medio de la prueba de Wilcoxon utilizando el Software JMP 7; en dicho software esta prueba es equivalente al estadístico U de Mann - Whitney. En cualquiera de los casos, se trata de una prueba no paramétrica, ya que las pruebas de normalidad y homocedasticidad de los residuos (prueba W de Shapiro – Wilk) indicaron que los datos no tienen una distribución normal y tienen varianzas diferentes. En todos los casos, se cumple con un valor de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$). Valores de probabilidad (p) menores que α indican diferencias significativas.

7.2.1 Concentración de clorofila

Utilizando el método tradicional de extracción de pigmentos fotosintéticos con acetona al 80%, es posible observar en la Figura 7.3 concentraciones mayores de clorofila $a+b$ en las muestras foliares ($n = 300$) de los individuos de *A. germinans* localizados en el Sitio Testigo respecto a los ubicados en el Sitio Contaminado. Utilizando el estadístico U se obtiene un valor $p = 0$, con lo que se confirma la existencia de diferencias significativas de la concentración de estos pigmentos entre ambos sitios.

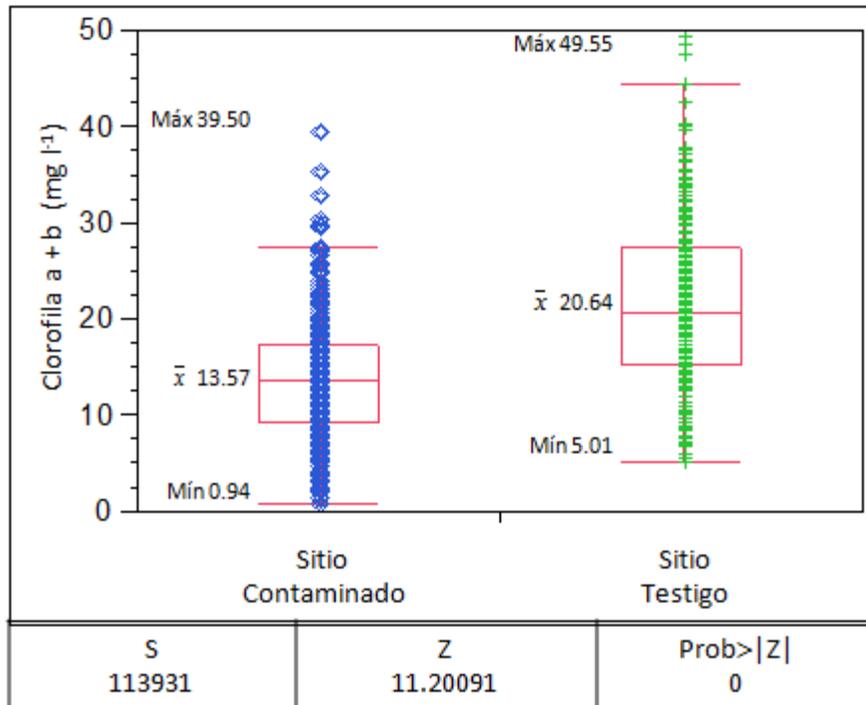


Figura 7.3 Concentración de clorofila a + b ($n = 300$) en el Sitio Contaminado y Testigo. S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $\text{Prob}>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

7.2.2 Biomasa y superficie foliar

En el caso de los resultados obtenidos para la biomasa foliar, el análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas entre los sitios evaluados, corroborando un menor desarrollo de la especie en el sitio con mayor concentración de HFP en el suelo ($p < 0.0163$) (Figura 7.4).

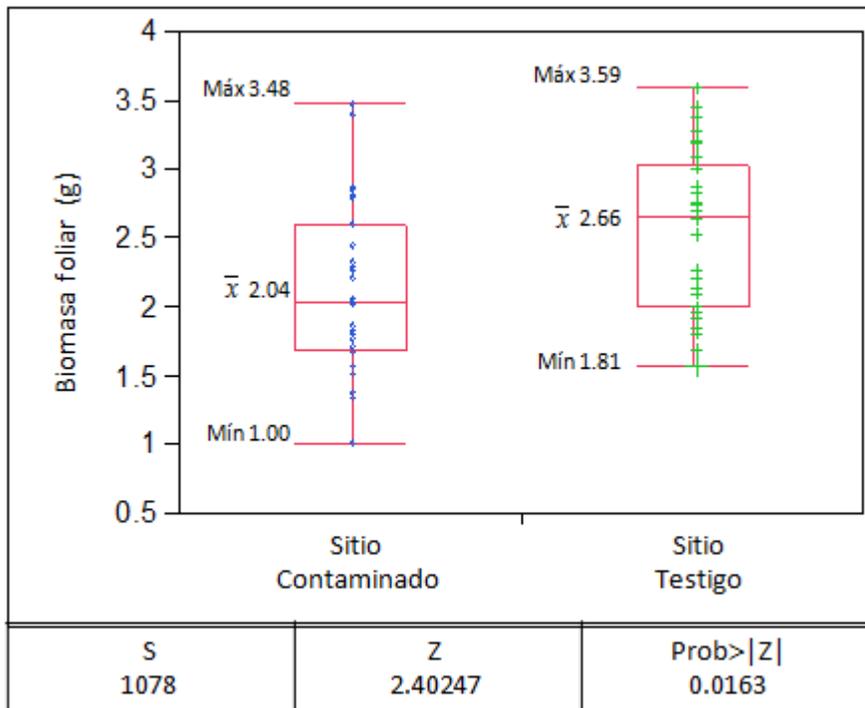


Figura 7.4 Biomasa foliar ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

En el caso de la superficie foliar, se presentó la misma tendencia que en la biomasa, con un valor $p < 0.0001$ (Figura 7.5).

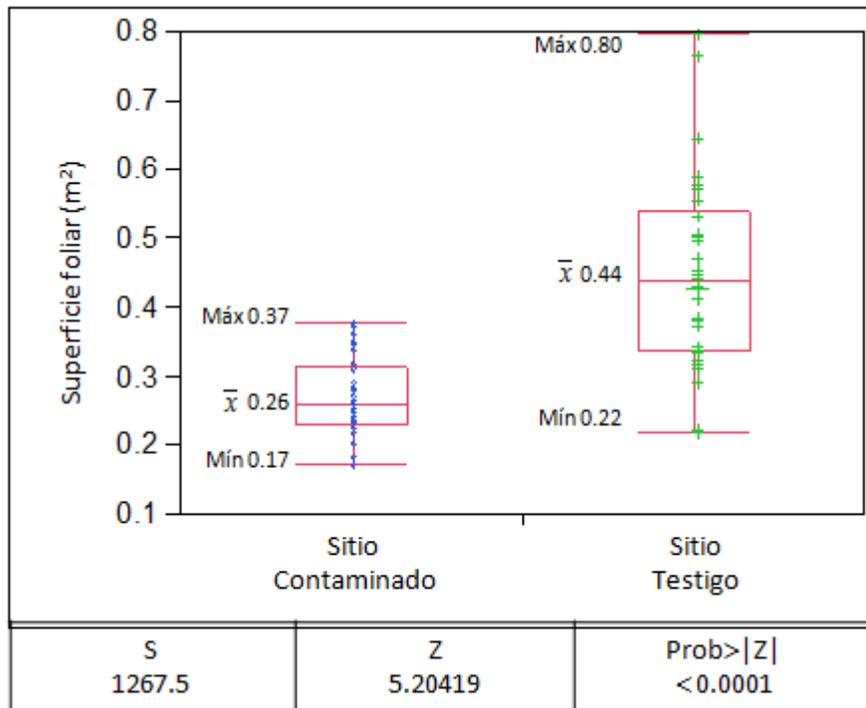


Figura 7.5 Superficie foliar ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

Para ambas variables, los resultados obtenidos reflejan que los individuos de *A. germinans* que habitan en el Sitio Contaminado tienen un menor desarrollo. Este comportamiento podría deberse a la presencia de los HFP o bien a algún parámetro ambiental como salinidad o nutrientes. Para aclarar esto se realizaron las correlaciones que se muestran posteriormente.

Adicionalmente, mediante un conteo estimado del número de hojas por árbol, se presentó la misma condición de valores inferiores en el Sitio Contaminado, con un promedio por árbol de 1 665 hojas, mientras que en el Sitio Testigo este valor fue de 7 580.

7.2.3 Eficiencia fotosintética

Los parámetros empleados para la evaluación de la eficiencia fotosintética son el cociente de la fluorescencia variable sobre la fluorescencia máxima (F_v/F_m) y el índice de desempeño (PI).

Con la cuantificación de dichas variables se busca observar si existen factores que limiten el desempeño fisiológico de los individuos de *A. germinans* en el Sitio Contaminado.

En los dos parámetros se obtuvieron diferencias significativas entre los sitios, presentando valores menores en el Sitio Contaminado.

Respecto a la variable de F_v/F_m , el valor p resultante del análisis estadístico aplicado es < 0.0001 (Figura 7.6), siendo significativamente diferentes.

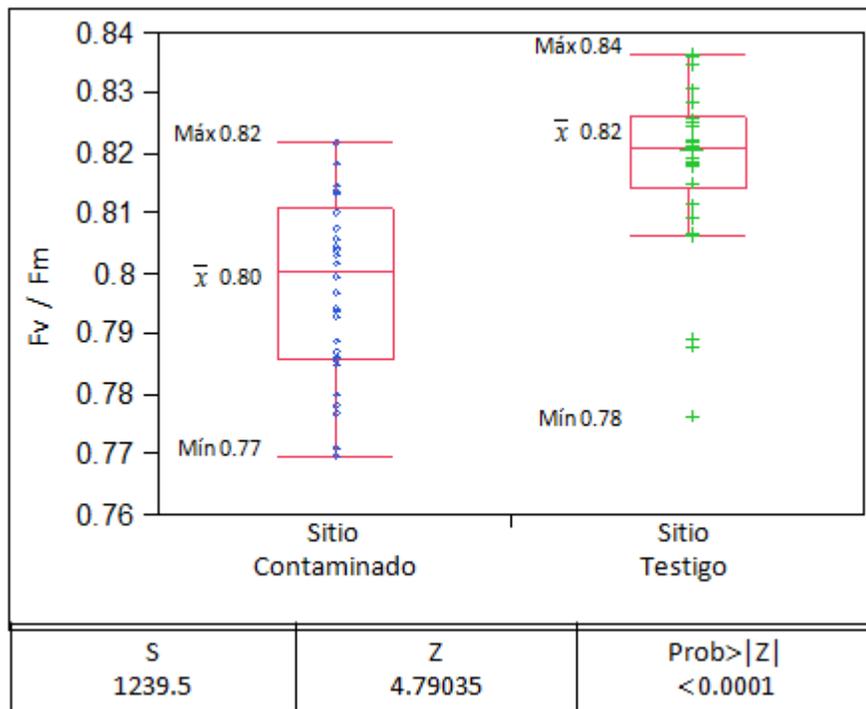


Figura 7.6 Eficiencia fotosintética ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

En el caso del índice de desempeño (PI) se presentó la misma tendencia que en parámetro anterior, con un valor $p < 0.0484$, señalando de la misma forma, diferencias significativas entre ambos sitios de estudio (Figura 7.7).

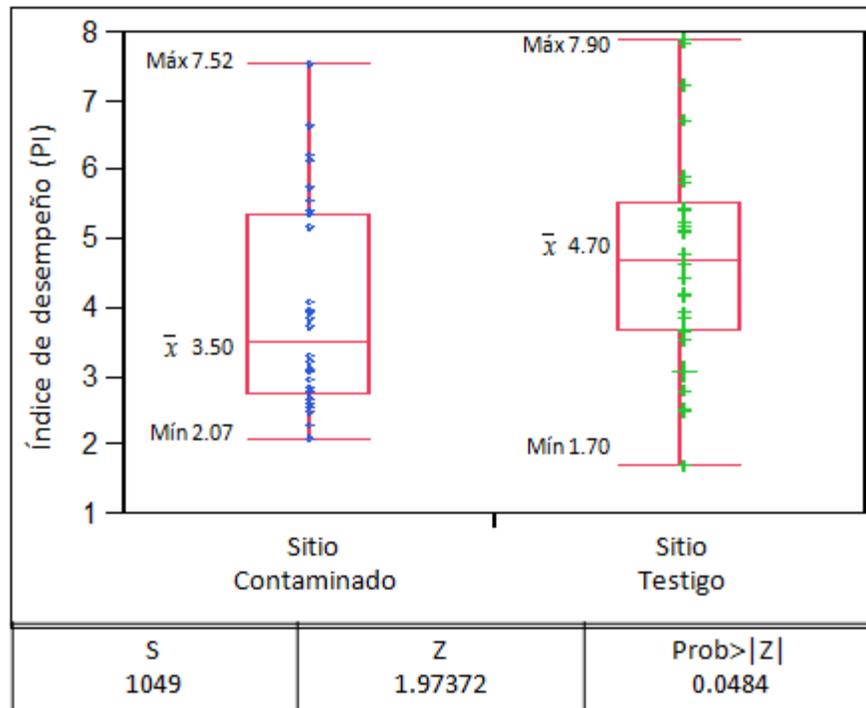


Figura 7.7 Índice de desempeño ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $\text{Prob} > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

7.2.4 Parámetros estructurales

La determinación de los parámetros estructurales tuvo como finalidad obtener evidencias cuantificables de un menor desarrollo en los individuos de *Avicennia germinans* en el sitio donde se encuentran las mayores concentraciones de hidrocarburos en el suelo (Sitio Contaminado).

La respuesta observada de esta especie en cuanto a la estructura de los individuos se reflejó al obtener diferencias significativas entre ambos sitios, presentando un valor $p < 0.0002$. Esto indica que los individuos de mangle en el Sitio Contaminado son significativamente más pequeños que los del Sitio Testigo (Figura 7.8). Al igual que en el caso de la biomasa y superficie foliar, el comportamiento descrito podría deberse a la presencia de los HFP o bien a algún parámetro ambiental como la

salinidad o los nutrimentos. Para corroborar esto, se realizaron las correlaciones que se muestran en la sección 7.3.

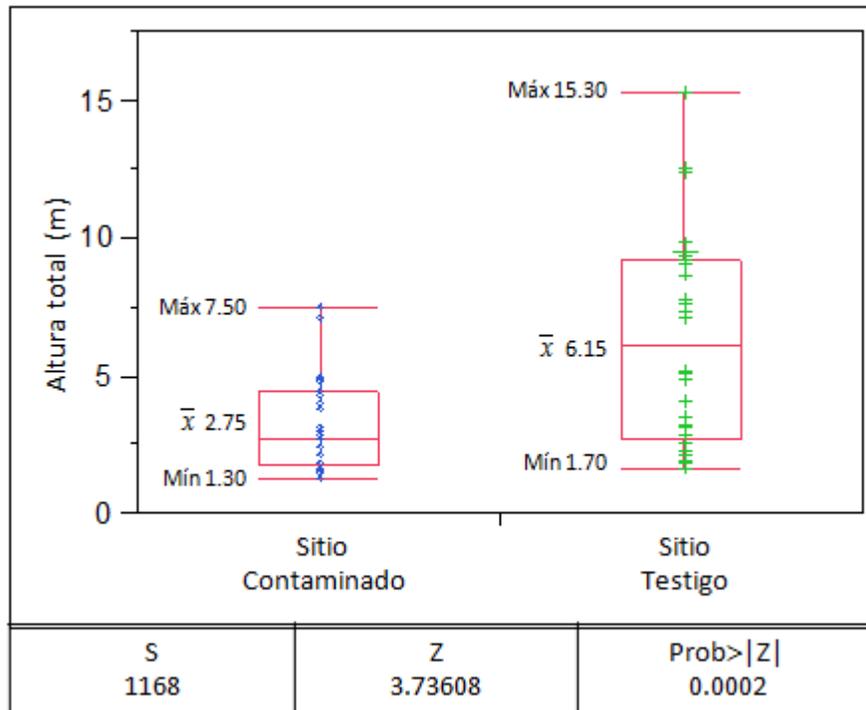


Figura 7.8 Altura total de *A. germinans* ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

En cuanto al diámetro a la altura del pecho (DAP) de los árboles estudiados mostraron la misma tendencia que los parámetros anteriores (Figura 7.9), presentando un menor desarrollo en el sitio que ha sido impactado por la presencia de hidrocarburos en el suelo respecto al Sitio Testigo ($p < 0.0019$).

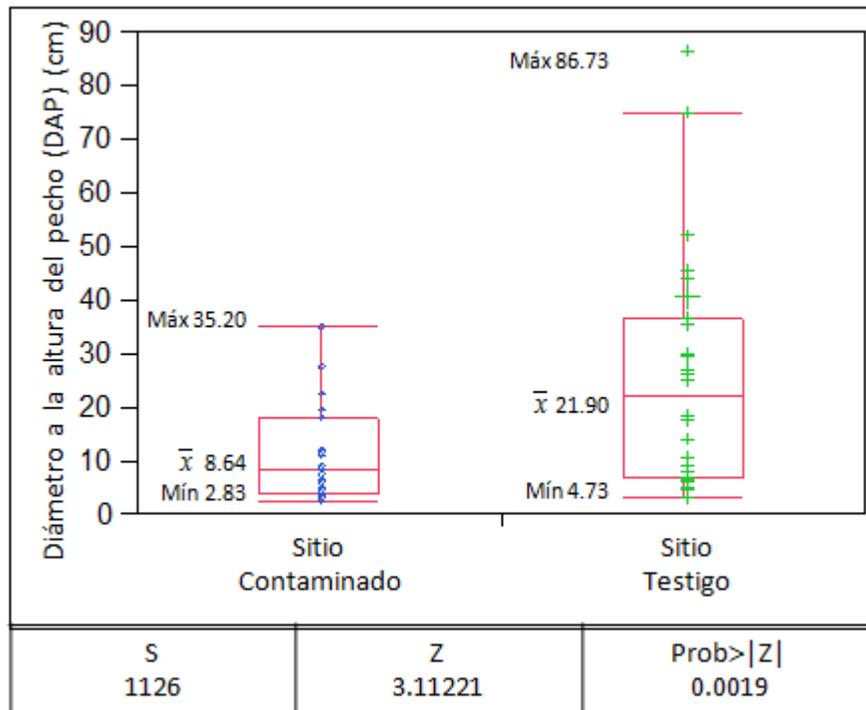


Figura 7.9 Diámetro a la altura del pecho DAP de *A. germinans* ($n = 30$).
 S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y
 $Prob>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado.
 $Máx$ = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, $Mín$ = Mínimo.

7.2.5 Hidrocarburos fracción pesada (HFP)

Para el presente trabajo, la concentración de los HFP es la variable de control, ya que a partir de dicho valor se realizará la evaluación del efecto de los hidrocarburos sobre la especie de mangle *A. germinans*.

El análisis estadístico correspondiente demostró que se presentan diferencias significativas entre los sitios estudiados ($p < 0.0001$), observándose de forma general valores mayores de HFP en el Sitio Contaminado respecto al Sitio Testigo (Figura 7.10).

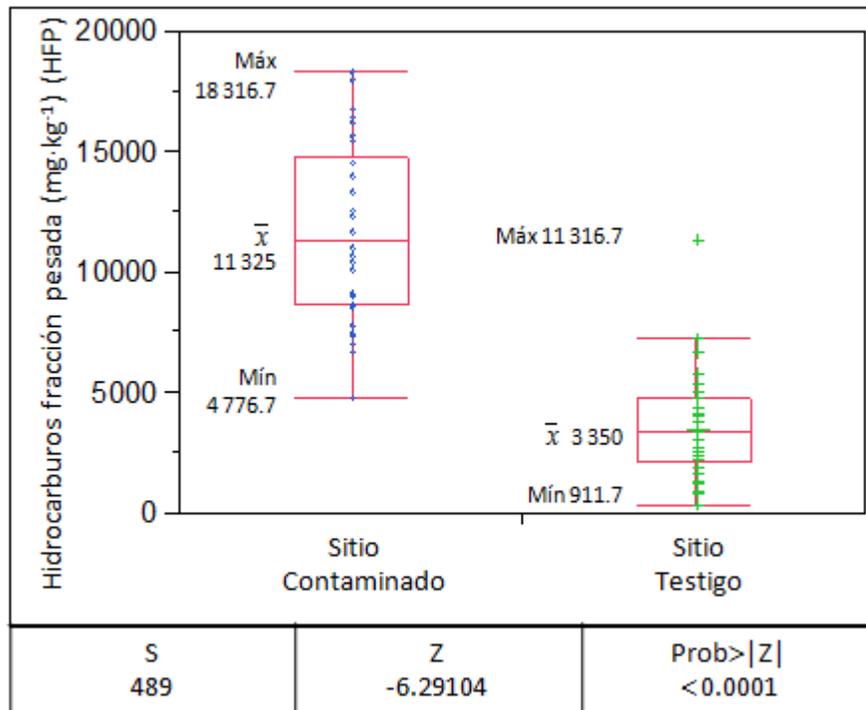


Figura 7.10 Hidrocarburos fracción pesada ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob>|Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

7.2.6 pH

Los resultados de pH de ambos sitios presentaron valores similares (Figura 7.11) sin observarse diferencias significativas, teniendo un valor de $p = 0.2971$, presentando valores de 6.82 a 8.37 en el Sitio Testigo y de 7.45 a 8.01 en el caso del Sitio Contaminado.

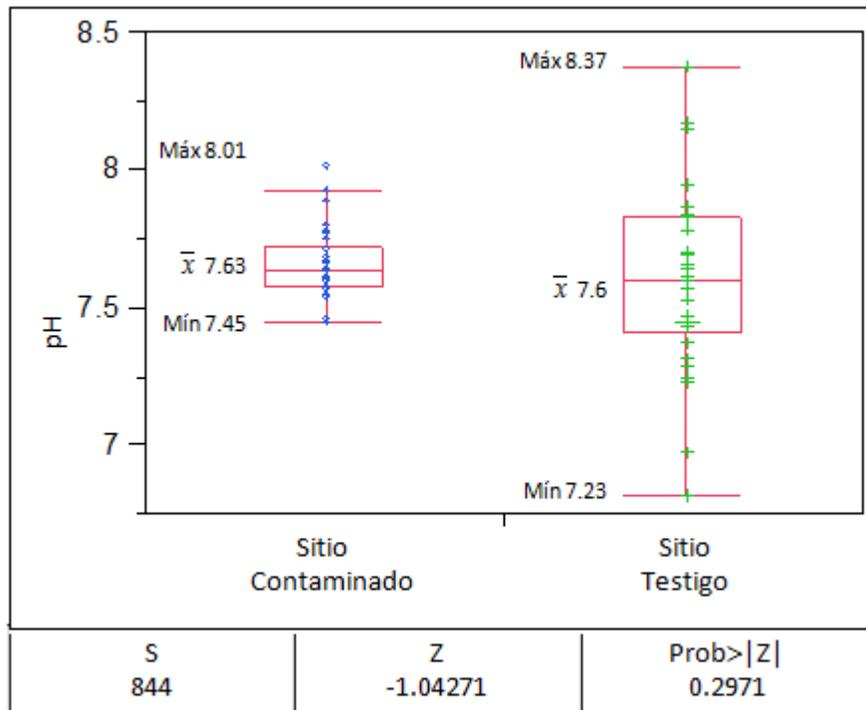


Figura 7.11 pH del suelo ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $Prob > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

De acuerdo con lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), las muestras obtenidas en ambos sitios corresponden en su mayoría a la clasificación de suelo medianamente alcalino, a excepción de seis muestras del Sitio Testigo, las cuales fueron clasificadas como muestras de suelo neutro.

7.2.7 Nitrógeno total

Los resultados obtenidos de nitrógeno total (Figura 7.12) no mostraron diferencias significativas entre ambos sitios ($p = 0.6716$).

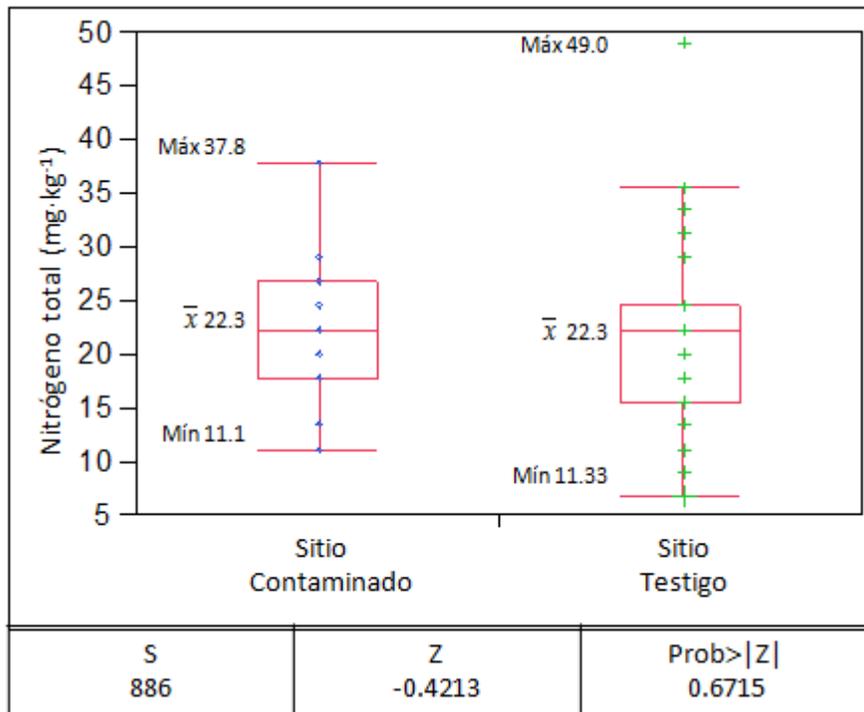


Figura 7.12 Nitrógeno total ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $\text{Prob} > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

Evaluando los resultados de acuerdo con lo señalado en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), los valores oscilaron en su mayoría de bajo a medio, presentándose, en el Sitio Contaminado un total de 10 muestras con un contenido bajo de nitrógeno total y 20 con un contenido medio. En el caso del Sitio Testigo, un total de dos muestras se clasificaron con un contenido muy bajo de nitrógeno, 12 como bajo, 15 como medio y una como alto.

7.2.8 Fósforo aprovechable

Los valores del fósforo aprovechable presentaron diferencias significativas entre los sitios ($p < 0.0001$), resultando en un mayor contenido de este nutrimento en el suelo del Sitio Testigo (Figura 7.13).

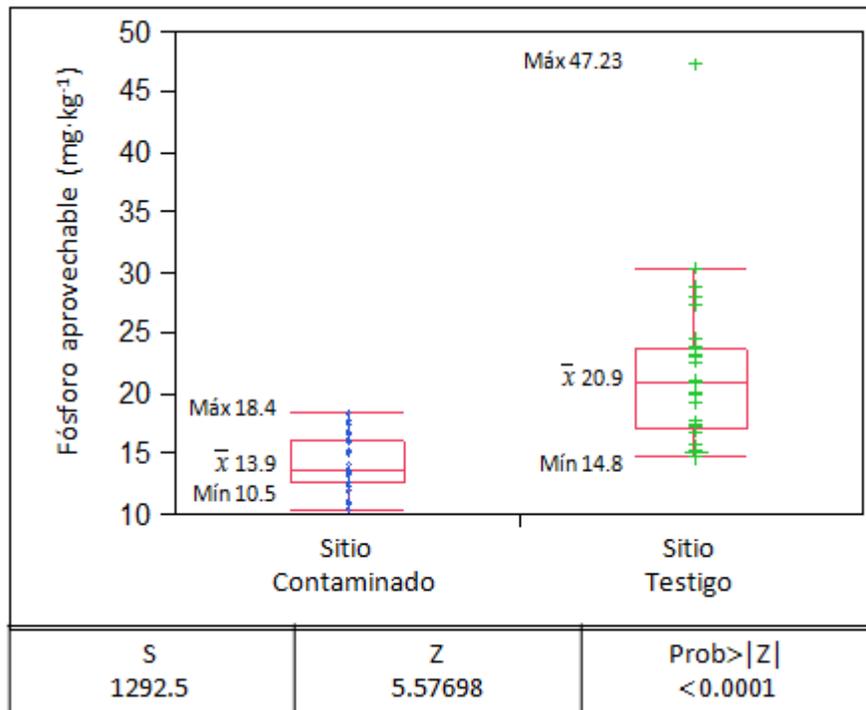


Figura 7.13 Fósforo aprovechable ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $\text{Prob} > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

Pese a presentar valores de fósforo aprovechable significativamente mayores en el Sitio Testigo respecto al Sitio Contaminado, de acuerdo con la interpretación de fertilidad establecida en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002) la mayoría de las muestras de ambos sitios corresponden a la clase de contenido alto, a excepción de cuatro muestras pertenecientes al Sitio Contaminado, las cuales corresponden a la clasificación de contenido medio de fósforo aprovechable.

7.2.9 Salinidad

La evaluación de la salinidad en el suelo se realizó por medio de la cuantificación de la conductividad eléctrica. Para dicho parámetro se presentaron diferencias significativas entre los sitios, donde la salinidad más alta se localizó en el SC (Figura 7.14), con un valor de significancia $p < 0.0001$.

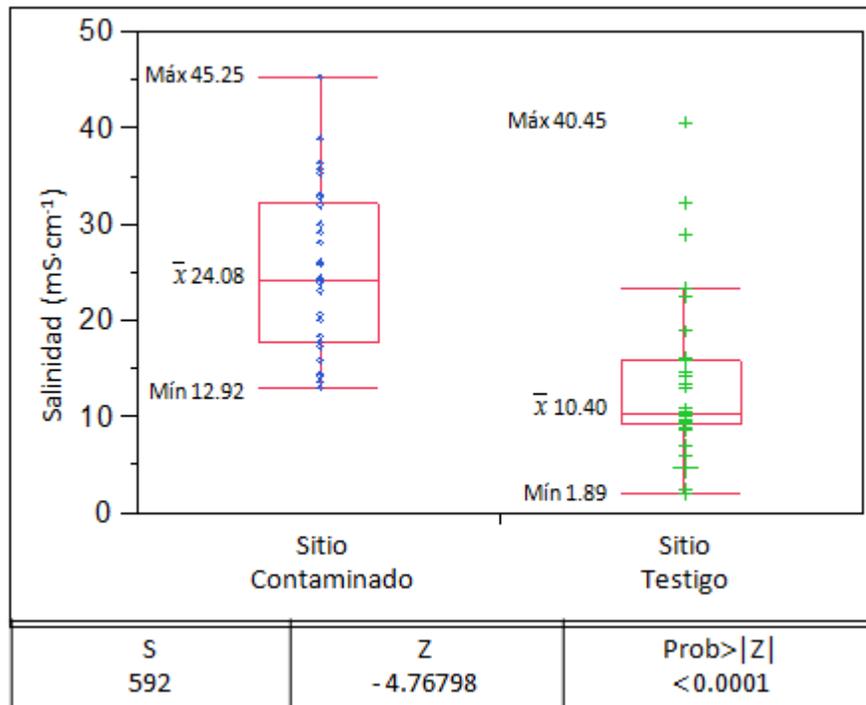


Figura 7.14 Salinidad ($n = 30$). S = desviación estándar, Z = aproximación normal a la desviación estándar (S) y $\text{Prob} > |Z|$ = Probabilidad de obtener al azar un valor Z mayor al calculado. Máx = Máximo, \bar{x} = Media aritmética, Mín = Mínimo.

Los valores de la salinidad presentaron una gran variabilidad, presentándose valores mínimos de 12.92 y 1.89 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ en los sitios Contaminado y Testigo, respectivamente; sin embargo, en la mayoría de los casos y de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), las muestras corresponden a suelo clasificado como muy fuertemente salino.

7.3 Correlación entre los parámetros analizados

Para la evaluación del efecto de los hidrocarburos sobre las variables cuantificadas se realizaron correlaciones simples.

Dichas correlaciones se analizaron tanto por sitio como de forma general (Sitio Contaminado y Sitio Testigo en conjunto). En la mayoría de los casos, las tendencias encontradas fueron las mismas.

Debido a la baja correlación obtenida entre los métodos de cuantificación de clorofila evaluados (método destructivo y no destructivo), los resultados obtenidos

por el método no destructivo (expresados en el texto como ICC) se excluyeron del análisis de correlación entre las variables estudiadas.

En la tabla 7.2 se presenta la matriz de correlaciones obtenida para los datos del Sitio Testigo, se observa que la mayor correlación se presentó entre los hidrocarburos fracción pesada y la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) presentando un cociente de correlación $r = -0.97$ (Figura 7.15), es decir, que existe una fuerte correlación inversa entre esos factores, indicando que a mayor concentración de HFP se tienen menores valores de eficiencia fotosintética.

De forma general se observa un efecto negativo pero de baja intensidad ($r \leq |0.38|$) de la salinidad sobre la mayoría de las variables analizadas, como es la concentración de clorofila, la biomasa y superficie foliar, así como el diámetro a la altura del pecho y la altura total.

Tabla 7.2 Matriz de correlación (valores de r) de las variables cuantificadas para el Sitio Testigo.

	pH	NT	HFP	Sal	FA	Cl	EF	PI	BF	SF	DAP	AT
pH	1											
NT	-0.09	1										
HFP	0.29	-0.12	1									
Sal	0.11	0.19	-0.3	1								
FA	-0.23	0.24	-0.03	0.01	1							
Cl	0.01	-0.23	0.04	-0.27	-0.22	1						
EF	-0.35	0.13	-0.97	0.33	0.05	-0.07	1					
PI	-0.21	0.04	-0.64	0.25	0.16	-0.16	0.59	1				
BF	-0.03	0.06	0.21	-0.26	-0.03	-0.02	-0.13	-0.23	1			
SF	0.02	-0.03	0.57	-0.4	-0.18	0.23	-0.55	-0.38	0.22	1		
DAP	-0.2	-0.34	-0.02	-0.29	0.2	0.31	0.04	-0.11	0.22	-0.11	1	
AT	-0.12	-0.29	0.12	-0.38	0.09	0.39	-0.14	-0.16	0.18	0	0.9	1

NT = Nitrógeno total ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), HFP = Hidrocarburos fracción pesada ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Sal = Salinidad ($\text{mS}\cdot\text{cm}$),
FA = Fósforo aprovechable ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Cl = Clorofila a+b ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), EF = Eficiencia fotosintética (Fv/Fm),
PI = Índice de desempeño, BF = Biomasa foliar (g), SF = Superficie foliar (m^2), DAP = Diámetro a la altura del pecho (cm), AT = Altura total (m).

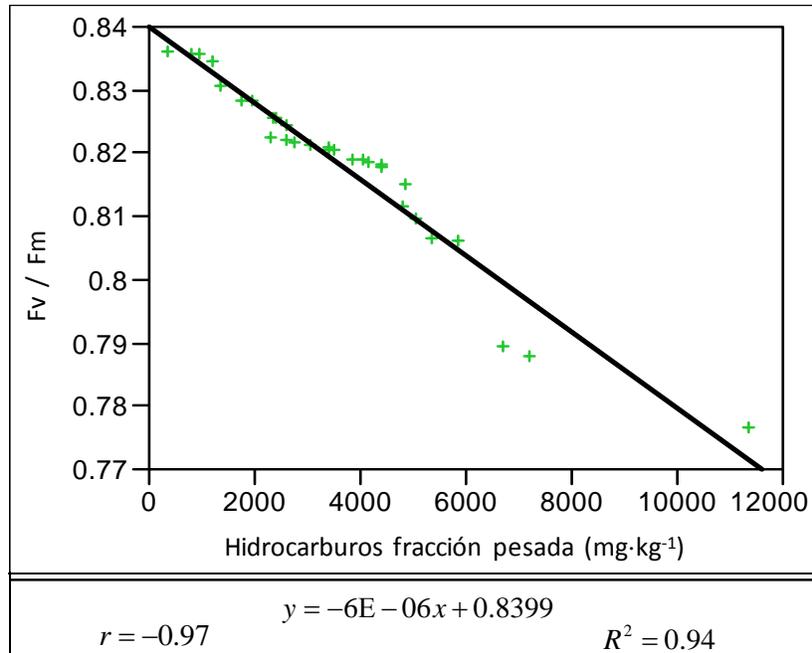


Figura 7.15 Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en el Sitio Testigo (n = 30). r = Coeficiente de correlación, R² = Coeficiente de determinación, y = Ecuación estimada para el comportamiento la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en función de la variable x (HFP).

En el caso del Sitio Contaminado (Tabla 7.3), de forma general se observa la misma tendencia que en el Sitio Testigo, es decir, una alta correlación entre la concentración de hidrocarburos fracción pesada y la eficiencia fotosintética con un coeficiente de correlación de r = -0.90 (Figura 7.16).

Tabla 7.3 Matriz de correlación (valores de r) de las variables cuantificadas para el Sitio Contaminado.

	pH	NT	HFP	Sal	FA	Cl	EF	PI	BF	SF	DAP	AT
pH	1											
NT	-0.28	1										
HFP	-0.4	0.12	1									
Sal	-0.29	0.27	-0.05	1								
FA	0	-0.06	-0.18	-0.2	1							
Cl	0.09	0.25	-0.02	-0.27	0.03	1						
EF	0.25	-0.17	-0.90	0.09	0.03	-0.09	1					
PI	0.31	-0.29	-0.66	0.11	-0.08	-0.25	0.72	1				
BF	0.04	-0.11	0.02	-0.30	0.20	0.15	-0.25	-0.18	1			
SF	-0.11	-0.09	0.21	-0.24	0.31	-0.01	-0.36	-0.17	0.76	1		
DAP	-0.01	0.08	-0.32	0.19	0.01	0.10	0.44	0.33	-0.15	-0.23	1	
AT	0.09	0.27	-0.24	0.07	0.27	0.30	0.26	0.12	-0.19	-0.28	0.67	1

NT = Nitrógeno total ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), HFP = Hidrocarburos fracción pesada ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Sal = Salinidad ($\text{mS}\cdot\text{cm}$), FA = Fósforo aprovechable ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Cl = Clorofila a+b ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), EF = Eficiencia fotosintética (F_v/F_m), PI = Índice de desempeño, BF = Biomasa foliar (g), SF = Superficie foliar (m^2), DAP = Diámetro a la altura del pecho (cm), AT = Altura total (m).

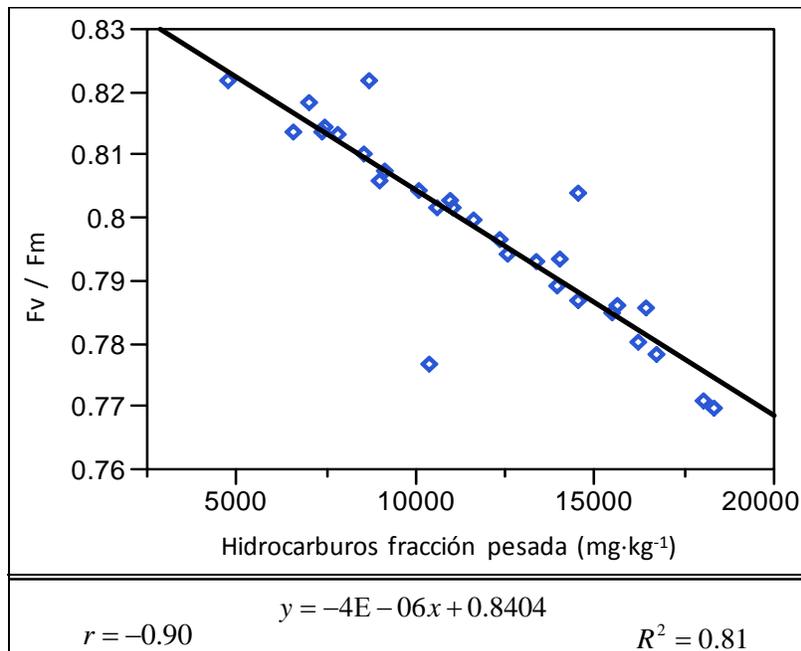


Figura 7.16 Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en el Sitio Contaminado ($n = 30$). r = Coeficiente de correlación, R^2 = Coeficiente de determinación, y = Ecuación estimada para el comportamiento la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en función de la variable x (HFP).

En la tabla 7.4 se presentan los resultados de las correlaciones de las variables considerando los datos de ambos sitios, Este análisis conjunto se realizó con la finalidad de analizar si en el caso de incrementar el número de valores era posible observar tendencias diferentes o con mayor magnitud.

Se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente para los Sitios Testigo y Contaminado: una correlación fuerte e inversa entre las concentraciones de HFP y la eficiencia fotosintética ($r = -0.91$) (Figura 7.17) y no se presentan otras correlaciones de importancia ya sea directas o inversas; los valores de r en el resto de las relaciones, en general son menores a $|0.57|$, a excepción de las relaciones entre el diámetro a la altura del pecho y la altura total (0.89), la cual es una relación considerada como normal, al estar biológicamente relacionados ambos parámetros.

Tabla 7.4 Matriz de correlación (valores de r) de las variables cuantificadas para ambos sitios.

	pH	NT	HFP	Sal	FA	Cl	EF	PI	BF	SF	DAP	AT
pH	1											
NT	-0.12	1										
HFP	0.10	0	1									
Sal	0.06	0.18	0.38	1								
FA	-0.23	0.14	-0.52	-0.37	1							
Cl	-0.05	-0.05	-0.52	-0.5	0.30	1						
EF	-0.20	0	-0.91	-0.19	0.38	0.33	1					
PI	-0.09	-0.09	-0.57	0	0.23	0.03	0.67	1				
BF	-0.05	-0.01	-0.22	-0.4	0.22	0.25	0.04	-0.10	1			
SF	-0.07	-0.03	-0.37	-0.57	0.32	0.52	0.10	-0.05	0.46	1		
DAP	-0.02	-0.21	-0.40	-0.34	0.38	0.45	0.35	0.12	0.23	0.18	1	
AT	-0.13	-0.13	-0.41	-0.44	0.37	0.56	0.28	0.07	0.21	0.29	0.89	1

NT = Nitrógeno total ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), HFP = Hidrocarburos fracción pesada ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Sal = Salinidad ($\text{mS}\cdot\text{cm}$),
 FA = Fósforo aprovechable ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Cl = Clorofila a+b ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), EF = Eficiencia fotosintética (F_v/F_m),
 PI = Índice de desempeño, BF = Biomasa foliar (g), SF = Superficie foliar (m^2), DAP = Diámetro a la altura del
 pecho (cm), AT = Altura total (m).

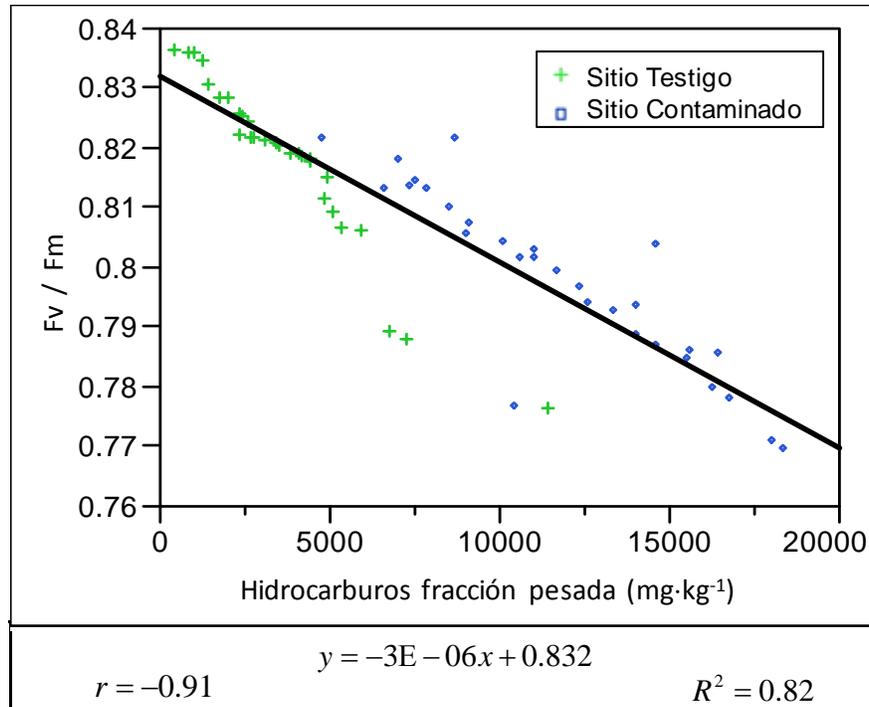


Figura 7.17 Correlación de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) respecto a la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en ambos sitios. r = Coeficiente de correlación, R^2 = Coeficiente de determinación, y = Ecuación estimada para el comportamiento la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en función de la variable x (HFP).

7.4 Análisis factorial 2^k

El análisis factorial es una herramienta estadística ampliamente utilizada en el análisis de experimentos, ya que permite de forma simultánea estudiar los efectos de cierto número de factores diferentes sobre una respuesta específica, basándose en analizar tratamientos que constan de todas las combinaciones posibles que puedan formarse de los factores incluidos (Anderson y McLean, 1974; Cochran y Cox, 1991; Montgomery, 1997).

De forma general, este tipo de análisis se divide en balanceado y desbalanceado en función de si los diferentes factores contienen el mismo número de datos o no, respectivamente. Cuando se cuenta con datos desbalanceados (como es el caso de este estudio), es posible recurrir a procedimientos que permiten convertirlos en datos balanceados, una de éstas herramientas es el uso de las medias de los factores o la estimación de los datos faltantes, en este caso se recurrió al uso de las medias, sin embargo, es importante destacar que al hacer uso de estas

conversiones, los resultados obtenidos del análisis factorial deben de ser considerados como aproximaciones (Montgomery, 1997).

Como el resto de los parámetros diferentes a la concentración de HFP en el suelo y la eficiencia fotosintética presentaron correlaciones bajas (inferiores al 67%) pese a que en su mayoría presentaron diferencias significativas entre el Sitio Contaminado y el Sitio Testigo, se pensó en otra forma de analizar los datos con el propósito de identificar el o los factores que pudieran estar interviniendo en estas diferencias. Para ello se aplicó un análisis factorial 2² con una repetición, con el uso del software Minitab 15.

Debido a que los datos utilizados no proceden de un experimento controlado, sino de mediciones realizadas en un ecosistema natural, los datos obtenidos fueron estructurados de tal forma que permitieran la realización de este análisis. Para este fin, se seleccionó el factor que mostró tener mayor relación (HFP) con la variable de respuesta (eficiencia fotosintética), así como otro factor que es considerado como limitante para el desarrollo de las especies de mangle (salinidad) (Lugo y Snedaker, 1974). Los datos de la variable de respuesta fueron ordenados con base en las condiciones que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7.5).

Tabla 7.5 Combinaciones de tratamientos y número de observaciones utilizadas en el análisis factorial.

Factores	
HFP*	Salinidad
-	-
+	-
-	+
+	+

*HFP = Hidrocarburos fracción pesada.

Donde, en el caso de los HFP, el nivel bajo (-) fue considerado de 0 a 10 000 mg·kg⁻¹ (39 observaciones) y el alto (+) ≥10 000 a mg·kg⁻¹ (21 observaciones). Respecto a los intervalos de la salinidad, el nivel bajo (-) corresponde al rango de 0 a 25 mS·cm⁻¹ (44 observaciones) y el nivel alto (+) ≥ 25 mS·cm⁻¹ (16 observaciones).

Mediante el análisis factorial se corroboró que la variable de respuesta está relacionada en mayor medida con la concentración de HFP en el suelo, mostrando para ésta el mayor coeficiente de interacción, lo que significa que estos dos parámetros son los que presentan una mayor relación (Tabla 7.6).

Tabla 7.6 Coeficientes de interacción.

Factor	Coeficiente
HFP*	-0.01483
Salinidad	-0.00164
HFP* · Salinidad	-0.00118

*HFP = Hidrocarburos fracción pesada.

De esta forma, se puede afirmar que la mayor eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en *Avicennia germinans* se presenta cuando se tiene la menor concentración de HFP en el suelo, sin ser determinante la salinidad de éste.

8. DISCUSIÓN

La comunidad de manglar estudiada en el presente trabajo representa claramente un caso de contaminación crónica por hidrocarburos, ya que de acuerdo con lo señalado por Olguín *et al.* (2007), las consecuencias de ésta pueden ser observadas únicamente a mediano o largo plazo, y se caracteriza por no tener efectos letales inmediatos. Dicho efecto a mediano y largo plazo permite que los organismos afectados puedan utilizar mecanismos de defensa ante el estrés al que se ven sometidos por medio de cambios fisiológicos y morfológicos (Gallegos, 1986).

8.1 Comparación de dos métodos de cuantificación de clorofila

En el caso de la comparación de los métodos de cuantificación de clorofila evaluados en este trabajo, este objetivo ha sido abordado en varios trabajos, principalmente con fines de optimización de la producción agrícola, ya que dentro de los beneficios de la implementación del método no destructivo está la obtención de resultados de forma rápida y fácil, factores que son de vital importancia para su implantación en estudios en campo (Cassol *et al.*, 2008).

Sin embargo, debido a las características fisiológicas y morfológicas específicas de cada especie, el método no destructivo de cuantificación de clorofila requiere realizar previamente la calibración específica para cada especie para la que se desee utilizar el medidor portátil (Hawkins *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, se cuenta con numerosos reportes respecto a la calibración del aparato para varias especies, principalmente de aquellas con gran valor comercial como el maíz, tomate, papa, trigo, tabaco, col, algodón, chícharo, así como algunos árboles frutales y de ornato como el maple y el abedul (Castelli *et al.*, 1996; Haripriya y Byju, 2008; Uddling *et al.*, 2007; Van Den Berg y Perkins, 2004), donde, en la mayoría de los casos coeficientes de determinación son suficientemente altos (> 0.8) como para poder sustituir el método tradicional de extracción de pigmentos por el método no destructivo que emplea un medidor portátil.

Pese a lo anterior, en el caso de este trabajo y con base en los resultados mostrados en la sección 7.1, se presentaron coeficientes de correlación y

determinación bajos (< 0.5), lo cual indica que no es posible sustituir el método destructivo de extracción de pigmentos en la especie *Avicennia germinans* por el índice de contenido de clorofila (ICC), obtenido con el medidor portátil Opti-Sciences CCM-200. Esta baja correlación puede deberse a varios factores, entre ellos la anatomía particular de las hojas de *A. germinans*, ya que éstas se caracterizan por ser coriáceas (más gruesas respecto a las de las especies para las cuales han sido reportados buenos resultados), y dicha condición puede causar interferencias en las propiedades de absorción y reflexión de la luz, las cuales son los principios utilizados por el medidor portátil para determinar los índices de clorofila (Cassol *et al.*, 2008; Opti-Sciences CCM-200, 2009). Otra de las razones por la cual pudiera impedirse el uso de este tipo de medidores portátiles es la distribución heterogénea de los pigmentos en las hojas (Cassol *et al.*, 2006), sin embargo, en este caso no es posible afirmar que ésta sea una de las causas, ya que para ello es necesario realizar una serie de experimentos los cuales no fueron objeto de estudio en este trabajo.

8.2 Comparación de las variables entre sitios

De forma simultánea al estudio de la comparación de los métodos de cuantificación de clorofila, se realizó la cuantificación en ambos sitios de estudio de variables fisiológicas y estructurales de los individuos de *A. germinans*, así como de características del suelo consideradas como importantes para su desarrollo.

En el aspecto fisiológico, al inicio del presente estudio se planteó la hipótesis de que los hidrocarburos podrían tener un efecto adverso en el contenido de clorofila; con el propósito de corroborar o descartar dicho efecto, se realizaron las pruebas estadísticas, donde fue posible determinar que existe una disminución significativa en la concentración de clorofila en los individuos que habitan en el Sitio Contaminado, lo que concuerda con los estudios realizados sobre el tema. Cabe aclarar que en la mayoría de los reportes existentes al respecto, como es el caso de Corredor (1990), Duke y Watkinson (2002) y Klekowski *et al.* (1994a; 1994b) éstos corresponden a un efecto extremo de dicho contaminante, el cual es la mutación genética de algunos árboles, derivando en el cese de la producción de clorofila y produciendo a su vez individuos de mangle albinos. Sin embargo, de forma general se reconoce que uno de los efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre

las plantas puede ser la destrucción de la clorofila, el amarillamiento y finalmente, la defoliación (Baker, 1970)

El Sitio Contaminado podría ser considerado como representativo de una de las primeras etapas de los casos antes mencionados de mutaciones, así como de clorosis foliar, el cual es un resultado de la contaminación por hidrocarburos en este tipo de ecosistemas y que ha sido reportado con anterioridad (NOAA, 2010).

También fueron cuantificadas la biomasa y la superficie foliar, en ambos casos se encontraron diferencias significativas entre los sitios, presentando menor peso y superficie en el Sitio Contaminado, este efecto ya ha sido reportado, tanto para otras especies de mangle, como para los organismos vegetales en general. Los efectos tóxicos de los hidrocarburos sobre las plantas son múltiples, y entre ellos se pueden encontrar la muerte de las hojas (Baker, 1970).

De forma específica para los individuos de mangle, se ha reportado esta misma situación como efecto de la contaminación de tipo crónico por hidrocarburos, observándose la disminución de la biomasa foliar en la especie *Rhizophora mangle* (Duke *et al.*, 1997), así como cambios en la morfología de las hojas de individuos de esta misma especie sometidos a la presencia de hidrocarburos (Duke y Watkinson, 2002; Ellison y Farnsworth, 1996).

Los efectos, así como la magnitud de los daños en este tipo de ecosistemas sobre las hojas de las plantas varía en función de múltiples factores, en los que sobresalen la cantidad y tipo de hidrocarburo, las condiciones ambientales y la biología específica de cada especie, sin embargo, en la mayoría de los casos las alteraciones en la morfología foliar de las plantas se produce principalmente por el efecto inhibitor del contaminante sobre diversos procesos vitales, tales como el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera; afectando a la respiración y transpiración (Baker, 1970), derivando en la limitación del desarrollo adecuado de las hojas, que es lo que pudiera estar produciendo un menor tamaño de éstas en el caso de este estudio.

Otro parámetro que denota si una planta está desarrollándose de forma adecuada es la fluorescencia de la clorofila α , la importancia de esta variable radica en que el crecimiento general de cualquier organismo vegetal representa el balance general

de la fotosíntesis, produciendo que los valores obtenidos de esta variable puedan proporcionar información importante respecto a su estado general, permitiendo un mejor manejo y aprovechamiento (Takemura *et al.*, 2000).

En el caso de este trabajo, los valores de fluorescencia de la clorofila *a* evaluados por medio del cociente F_v/F_m (fluorescencia variable / fluorescencia máxima) es un parámetro frecuentemente utilizado y aceptado para medir la eficiencia máxima del fotosistema II (Maxwell y Johnson, 2000), y es reconocido que esta eficiencia responde a una combinación factorial que incluye elementos vitales para el desarrollo de las plantas, tales como el suministro apropiado de nutrientes más factores estresantes (Ball *et al.*, 1994; Bown *et al.*, 2009; Krause y Weis, 1991), como es el caso de la contaminación por hidrocarburos.

Para este parámetro (F_v/F_m) ha sido posible establecer un radio considerado como típico para la mayoría de los autores, éste va de 0.80 a 0.83, el cual ha sido observado en una gran variedad de plantas que se desarrollan bajo condiciones consideradas como adecuadas (Ball *et al.*, 1994; Krause y Weis, 1991; Strasser *et al.*, 2000); estos valores concuerdan de forma general con los cuantificados para este trabajo, donde se presentó un valor promedio de 0.82 para el Sitio Testigo y de 0.79 para el Sitio Contaminado, lo que indica, en el caso de este último, que algún tipo de estrés podría estar actuando en una mayor magnitud sobre el proceso fotosintético de *A. germinans*.

No se cuenta con reportes específicos respecto al efecto de la contaminación por hidrocarburos en el suelo sobre este parámetro en árboles de mangle, sin embargo, en la literatura se señala que uno de los efectos de este tipo de perturbación sobre las plantas es la inhibición de los procesos fotosintéticos, esto debido principalmente a la destrucción de la clorofila (como ya fue señalado anteriormente), así como en algunos casos por la acumulación de los hidrocarburos en los tejidos, ya sea en los espacios intracelulares o en el sistema vascular de la planta (Baker, 1970).

La eficiencia fotosintética también puede ser inhibida por otras condiciones del medio ambiente, principalmente por el suministro de nitrógeno y fósforo (Bown *et al.*, 2009); dichos resultados serán discutidos posteriormente, aunque cabe destacar que en ambos casos, de forma general se encontró que tanto los niveles

de fósforo aprovechable y de nitrógeno total en el suelo se encuentran en concentraciones clasificadas en los niveles de medio a alto de acuerdo con lo establecido por la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002).

En el aspecto estructural, en un estudio previo realizado por el Instituto de Ingeniería, UNAM, en la misma zona de estudio, se había observado una menor altura de los individuos de mangle en el Sitio Contaminado respecto a los que habitaban en el Sitio Testigo. Debido a lo anterior, en el presente estudio se comparó estadísticamente los parámetros de altura total y diámetro a la altura del pecho.

Los resultados obtenidos demostraron que existen diferencias significativas entre los sitios para ambas variables, donde los individuos con menor talla (altura total y diámetro a la altura del pecho) son los que habitan en el Sitio Contaminado, con lo cual se muestra una deficiencia en el crecimiento de los árboles de *A. germinans*, lo anterior puede deberse a los efectos tóxicos directos que pueden tener los hidrocarburos sobre la vegetación, y en el caso de las especies de mangle, además a la adhesión del crudo a las raíces aéreas (neumatóforos) propios de este tipo de vegetación, con lo cual se inhibe además del intercambio gaseoso, otros procesos sumamente importantes como lo son la asimilación de nutrientes como el nitrógeno y fósforo (Olguín *et al.*, 2007), los cuales son factores limitantes para el desarrollo de la mayoría de las plantas, este último punto podría ser el caso del presente estudio, ya que como se discutirá posteriormente con mayor profundidad, los niveles de estos dos nutrientes difícilmente podrían ser un factor limitante para su desarrollo, permitiendo considerar que no están siendo aprovechados por *A. germinans* de manera adecuada.

Además, este efecto es una consecuencia comúnmente reportada desde el inicio de los estudios de este tipo, tal como lo menciona Lewis (1983), ya que a diferencia del efecto letal que caracteriza a la contaminación de tipo aguda, en el caso de comunidades vegetales sometidas durante un largo periodo de tiempo a la presencia de los hidrocarburos, la consecuencia más notoria es la inhibición de su crecimiento.

De la misma forma que en el caso de las características fisiológicas y estructurales analizadas anteriormente, se realizó la cuantificación de algunas características

químicas del suelo, éstas fueron seleccionadas en función de su importancia para el desarrollo de los árboles de *A. germinans*.

En el caso de los hidrocarburos de fracción pesada, como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, son considerados como un problema ambiental común en la mayoría de las regiones donde se distribuyen los ecosistemas de manglar debido principalmente a su localización geográfica cercana a las áreas de extracción y/o transporte de este compuesto (Gallegos, 1986; Olgúin *et al.*, 2007). En los sitios donde se desarrolló este trabajo se encontraron diferencias significativas entre las localidades señaladas como Sitio Testigo y Sitio Contaminado, presentándose concentraciones mayores de HFP en el Sitio Contaminado, donde los valores registrados en promedio son de 3 750 y 11 777 mg·kg⁻¹ en los Sitios Testigo y Contaminado, respectivamente.

Dichas concentraciones de HFP sobrepasan en su mayoría a los límites máximos permisibles establecidos en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005), que establece un valor máximo de 3 000 mg·kg⁻¹ para áreas de uso de suelo residencial, forestal, recreativo y/o de conservación. En todos los casos del Sitio Contaminado fue superado dicho valor, y para el sitio Testigo se excedió el límite en 16 de los 30 puntos analizados.

Si bien es sabido que las fracciones ligeras de hidrocarburos son las más tóxicas para la biota en general, éstas son las primeras en ser eliminadas del sistema al volatilizarse o degradarse. También se reconoce que los hidrocarburos fracción pesada son los que pueden llegar a producir un mayor daño en los ecosistemas ya que persisten en el suelo y sedimento, especialmente en los ecosistemas de manglar, que al presentar altos contenidos de materia orgánica, favorecen su acumulación, siendo difícilmente degradables (Corredor *et al.*, 1990; Olgúin *et al.*, 2007). Esta persistencia en el medio ha sido corroborada en varias ocasiones; Burns *et al.* (2000) observaron que a pesar de seguir protocolos de biorremediación en un área de manglar contaminada por petróleo crudo, los niveles de este contaminante no descendieron de forma significativa.

Existen muy pocos estudios respecto al efecto a largo plazo de la contaminación por hidrocarburos en manglares, debido a su alta complejidad y al gran número de factores que deben de ser considerados para su estudio; entre éstos destaca la

revisión realizada por Lewis (1983), donde al documentar numerosos casos de derrames de crudo en las costas del Mar Caribe, fue capaz de generalizar los efectos de estos accidentes a corto y mediano plazo. Sin embargo, debido a la escasa documentación de los efectos crónicos (característicos de la contaminación a largo plazo) no le fue posible establecer la escala de tiempo en la cual se presenta la recuperación completa del sistema, aunque plantea como posible que ésta se dé en un periodo de entre 10 y 50 años después del evento contaminante. Con base en esto y comparándolo con los efectos nocivos que fue posible detectar en este estudio, se puede afirmar que los daños aún se siguen presentando a más de 100 años del derrame de crudo, manifestándose a través de los múltiples parámetros fisiológicos mencionados anteriormente.

Sin embargo, para corroborar que la alta concentración de HFP es el factor responsable del deterioro de las condiciones fisiológicas y morfológicas discutidas anteriormente, es necesario analizar otras variables que pudieran producir el mismo efecto sobre *A. germinans*, como lo son los principales nutrientes limitantes (nitrógeno y fósforo), la salinidad por ser un factor característico de este tipo de ecosistemas, y potencialmente tóxico en concentraciones extremas, así como el pH.

En el caso del pH del suelo del ecosistema estudiado, el valor promedio fue de 7.6, sin presentarse diferencias significativas entre el Sitio Contaminado y el Sitio Testigo, este valor es más alcalino que la mayoría de los casos abordados en la literatura consultada, ya que en estos el pH oscila de 4.3 en un manglar sin contaminación en Nigeria (Effiong y Ayolagha, 2010) a 6.85 en una localidad colombiana del Río Magdalena, Colombia (Cardona y Botero, 1998) y de 6.81 en un bosque de mangle en Hong Kong (Tam y Wong, 1998). El único caso encontrado donde se presentan valores similares es en Indonesia, donde los valores promedio fueron de 7.13 a 7.71 (Suprayogi y Murray, 1999). Este pH más elevado pudiera deberse a las características edafológicas del sitio, ya que corresponde a un suelo de tipo vertisol, el cual por lo general presenta valores de pH alcalinos debido a la presencia de los iones de Ca^+ y Mg^+ (Porta *et al.*, 2003), así como en el caso del Sitio Contaminado, a la entrada de agua hipersalina por parte del cuerpo de agua localizado al suroeste de este sitio y que en época de lluvias desborda hacia la zona

mencionada (Figura 5.1); este cuerpo de agua posee una salinidad superior a la del agua de mar, según algunas personas que han trabajado en este cuerpo de agua.

Es importante señalar que en la literatura se especifica que, de forma general, los suelos y sedimentos de los ecosistemas de manglar tienden a la acidez debido a los procesos de descomposición de la gran cantidad de materia orgánica que se encuentra en ellos y a las condiciones anóxicas (Lugo y Snedaker, 1974; Tomlinson, 1986), sin embargo, debido a las características alcalinas antes mencionadas, propias de los vertisoles, se pudieran estar produciendo las condiciones cercanas a la neutralidad encontradas en los sitios estudiados.

En el caso de los resultados de nitrógeno total, los valores de dicho nutriente presentaron un mínimo de 11.1 y un máximo de 49.0 mg·kg⁻¹, oscilando en su mayoría entre los niveles bajo a medio, esto de acuerdo con la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), y no presentaron diferencias significativas entre los sitios. El contenido de este nutriente, y en general de todos, en los ecosistemas de manglar tiende a ser muy variable, ya que la cantidad de éste dependerá en gran medida de factores específicos tales como la geología, hidrología y múltiples factores bióticos (Boto y Wellington, 1983).

Pese a lo anterior, fue posible encontrar ciertas similitudes con algunos de los reportes revisados, como es el caso de un ecosistema dominado por la especie *Avicennia marina* localizado en Sierra Leona (Hesse, 1961) y otro ubicado en Venezuela (Rivera-Monroy *et al.*, 2004), donde se presentaron contenidos de nitrógeno de 15.2 y 18 mg·kg⁻¹ respectivamente, los cuales pueden ser considerados como bajos si se aplica el criterio establecido por la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002). En ninguno de los dos casos mencionados se concluye que el contenido bajo de nitrógeno total pudiera ser considerado como limitante para el desarrollo de las respectivas especies estudiadas (Hesse, 1961; Rivera-Monroy *et al.*, 1974), por lo que se podría pensar que este también es el caso del presente estudio.

Considerando el punto anterior, es difícil hacer una comparación entre la concentración de nitrógeno total cuantificada en este trabajo con otras investigaciones reportadas anteriormente, ya que estos valores oscilaron de cerca de 10 mg·kg⁻¹ en un ecosistema dominado por *Rhizophora mangle* localizado en

Venezuela (Rivera-Monroy *et al.*, 2004) a valores superiores a los 400 mg·kg⁻¹ en una localidad de Sierra Leona (Hesse, 1961).

Por otro lado, de acuerdo con la clasificación presentada por la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), en el caso del fósforo aprovechable, las muestras corresponden a un contenido de medio a alto. Sin embargo, de forma general se ha reconocido que el contenido de fósforo en el suelo de los manglares tiende a ser bajo, siendo así un elemento limitante para la productividad en estos ecosistemas (Alongi, 1996; Hogarth, 1999), por lo que de acuerdo con estos autores la disponibilidad de fósforo para ambos sitios no debería ser un problema para el desarrollo adecuado de los individuos de mangle estudiados en este trabajo.

Asimismo, fueron encontradas diferencias significativas entre los sitios, presentándose un mayor contenido de fósforo aprovechable en el Sitio Testigo, esto pudiera deberse a las actividades de ganadería y agricultura que se realizan tierra adentro, a partir de las cuales se podría estar presentando la adición de este nutriente, principalmente como producto del uso de fertilizantes.

Comparando los resultados obtenidos con los reportes de otros autores en ecosistemas similares, se encontró que hay una gran variabilidad, de la misma forma que en el caso del nitrógeno total, ya que los datos señalados en este caso varían de 500 mg·kg⁻¹ en un ecosistema de mangle venezolano dominado por *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* con suelo regenerado después de una perturbación severa (Rivera-Monroy *et al.*, 2004) a 9.06 mg·kg⁻¹ en un bosque de manglar en Nigeria dominado por *Rhizophora racemosa* en un suelo sin contaminación aparente (Effiong y Ayolagha, 2010).

Los resultados más cercanos a lo cuantificado en el presente son los señalados por Suprayogi y Murray (1999) con una concentración de 13.11 mg·kg⁻¹ en un experimento montado con suelo y plántulas obtenidas de un ecosistema de manglar localizado en Indonesia, donde las especies dominantes son *Rhizophora mangle*, *Rhizophora stylosa* y *Avicennia marina*. En este experimento se adicionaron diferentes cantidades de hidrocarburo al suelo, permitiendo observar que las concentraciones de este nutrimento son altamente variables.

Otro factor de suma importancia para la especie estudiada es la salinidad, ya que el establecimiento de los manglares depende en gran medida del contenido de sal tanto en el agua como en el suelo (Tomlinson, 1986), debido a que los parámetros biofísicos de las especies de mangle tienden a decrecer en ambientes con condiciones extremadamente salinas, este efecto fue corroborado por Panda *et al.* (2006), quienes encontraron que el incremento de la salinidad ($56 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) produce la disminución de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m), decreciendo 16% en individuos del género *Avicennia*. Esto coincide con los datos encontrados en el presente trabajo, ya que el área con mayor contaminación por HFP también presentó los mayores valores de salinidad en el suelo, con un valor promedio de $45.25 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ en el sitio mencionado y presentándose diferencias significativas entre los sitios estudiados.

También se cuenta con reportes donde se indica, que bajo condiciones de una considerable hipersalinidad, se produjo la muerte de árboles de mangle de las especies *R. mangle*, *A. germinans* y *L. racemosa* en un ecosistema localizado en el Delta del Río Magdalena, Colombia (Cardona y Botero, 1998).

Sin embargo, es importante mencionar que en este caso, la mayor salinidad del Sitio Contaminado respecto al Sitio Testigo puede atribuirse a la influencia de un cuerpo de agua con un contenido de sal superior al del agua de mar³ y cuyo cauce natural es cercano al SC, dicha influencia de las características hidrológicas sobre la salinidad del suelo es bastante conocida, siendo reportada comúnmente en la literatura (Porta *et al.*, 2003).

Pese a lo anterior, debe de hacerse énfasis en que *A. germinans* es una especie de mangle que se caracteriza por ser la que presenta mayor tolerancia a condiciones hipersalinas (Tomlinson, 1986), por lo que no es de esperarse que éste sea un factor limitante de su desarrollo.

8.3 Correlación entre los parámetros analizados

Como se ha venido explicando, la respuesta de los organismos ante situaciones de estrés es muy variable y siempre dependerá de la conjunción de todas las

³ Datos no publicados.

condiciones en las que estos se desarrollen, sin embargo es posible establecer qué parámetros son los que están ejerciendo una mayor influencia (ya sea positiva o negativa) sobre su desarrollo. En el caso de este trabajo, la forma de determinar qué característica del medio tiene mayor influencia sobre las variables de respuesta es mediante coeficientes de determinación (R^2) y correlación (r), ya que dichos estadísticos han mostrado eficacia para el estudio de sistemas naturales en los cuales no es posible establecer un diseño de experimentos (Snedaker y Snedaker, 1984).

Mediante esta metodología fue posible determinar qué variables están ejerciendo un mayor efecto sobre otras. Con base en los resultados presentados en la sección 7.3 de este trabajo, se puede considerar que los parámetros con mayor relación son los HFP respecto a la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) evaluada por medio de la fluorescencia de la clorofila a , con valores de determinación y correlación de 0.82 y -0.91, respectivamente. Este efecto nocivo ha sido reportado en algunas ocasiones con anterioridad, principalmente en algas, como son los casos de Marwood *et al.* (1999; 2001) y Ralph y Burchett (1998), donde señalan que la fluorescencia de la clorofila a es el parámetro que mostró ser más sensible a la presencia de los hidrocarburos en el medio; en todos los casos las tendencias encontradas coinciden con los resultados obtenidos para *A. germinans* en este trabajo.

Otra variable que mostró tener un efecto constante, aunque de menor magnitud es la salinidad, la cual mostró tener una correlación negativa con todas las variables de respuesta analizadas de forma conjunta para ambos sitios a excepción del pH y el nitrógeno total, la magnitud de las correlaciones inversas va de -0.19 respecto a la eficiencia fotosintética (F_v/F_m), hasta -0.57 en el caso de la concentración de clorofila $a + b$, tendencia que muestra ciertas similitudes con lo encontrado por Panda *et al.* (2006), quienes observaron que de forma general los parámetros biofísicos de las especies de mangle decrecen en ambientes con altas salinidades, induciendo alteraciones funcionales múltiples, entre ellas las del fotosistema II, las cuales son evaluadas mediante la fluorescencia de la clorofila a , siendo en este último caso donde no se llega a la misma conclusión, dado que en este trabajo se pudo determinar que el parámetro menos sensible a las condiciones hipersalinas es la eficiencia fotosintética. Esto puede deberse a la especie estudiada corresponde al género *Rhizophora*, a diferencia del presente trabajo, donde la especie estudiada

es *Avicennia germinans*, a la cual se le reconoce como una de las especies de mangle con mayor tolerancia a condiciones ambientales hipersalinas (Tomlinson, 1986).

El resto de las variables analizadas no mostraron coeficientes de correlación suficientemente altos, siendo en general menores de $|0.67|$, a excepción de la relación entre el diámetro a la altura del pecho respecto a la altura total ($r = 0.89$), sin embargo, este alto valor de correlación es normal, debido a las relaciones morfométricas entre ambos parámetros. Por lo que, a excepción de estas variables, en el caso del resto, no es posible considerar que su interacción tenga un efecto considerable en su comportamiento.

Los resultados obtenidos a partir del análisis factorial 2^2 coinciden con la tendencia observada por medio del coeficiente de correlación, esto es, que la mayor relación se presentó en el caso de la interacción entre los HFP y la eficiencia fotosintética, obteniéndose para este caso el mayor coeficiente de interacción (-0.01483), indicando que la mayor eficiencia fotosintética (F_v/F_m) se presenta bajo las menores concentraciones de HFP en el suelo. Este resultado corrobora que los individuos de *A. germinans* están presentando alteraciones fisiológicas importantes, ya que esta disminución de la eficiencia fotosintética se puede deber principalmente a la acumulación de sustancias procedentes de los HFP en los espacios intracelulares, así como en los cloroplastos de la planta, el cual es un efecto documentado de la contaminación por hidrocarburos sobre las plantas, lo que tiene como consecuencia la inhibición del proceso fotosintético; este efecto ha sido reportado para varias especies vegetales, como árboles de diferentes cítricos, manzana, plátano y algunas algas marinas (Baker, 1970).

En el caso del efecto de la salinidad sobre la eficiencia fotosintética, también es posible observar que el efecto es de una menor magnitud, observándose en el análisis factorial un coeficiente de interacción de -0.00164, inferior al de los HFP, las causas de este efecto mínimo ya se han explicado anteriormente, pero cabe recalcar que una de las principales causas podría ser la gran tolerancia a salinidades altas, típica de la especie estudiada.

En el caso de la evaluación del uso de alguno de los parámetros cuantificados en este trabajo como un posible indicador ambiental, es importante considerar que

existen ciertas características que deben de ser cumplidas para que un parámetro pudiera ser considerado como un indicador ambiental, entre ellas se encuentra que éste refleje en su comportamiento el efecto de una perturbación, ser fácilmente medible, no requerir mayores costos para su cuantificación, así como una capacitación mínima del personal que realiza las mediciones directamente en campo (Evans *et al.*, 2003).

Al realizar la evaluación de si algunos de los parámetros analizados en este trabajo cumple con las características antes mencionadas para ser considerado como un indicador adecuado para la determinación cuantitativa del deterioro de ecosistemas de manglar contaminados por hidrocarburos, la única variable que cumple con dichas características es la eficiencia fotosintética evaluada mediante el cociente F_v/F_m , además de contar con documentación previa de su utilización con buenos resultados para otras especies (Krause y Weis, 1991; Strasser *et al.*, 2000). Ralph y Burchett (1998) y Marwood *et al.* (1999; 2001) destacan la eficacia que tiene dicho cociente para la estimación de la presencia de efectos adversos sobre plantas acuáticas (macro y microalgas) por la acción de contaminantes producidos por la industria petroquímica vertidos en el agua, sin embargo no se cuenta con reportes de la utilización de este parámetro en la especie *Avicennia germinans* para la misma clase de contaminantes.

El uso de este parámetro como indicador ambiental además podría ser una herramienta para favorecer un mejor entendimiento de las consecuencias que pueden llegar a presentar los ecosistemas de manglar como producto de la contaminación crónica por hidrocarburos, ya que ha sido señalada la dificultad que representa la generalización de las respuestas de este tipo de comunidades vegetales debido a la gran variabilidad biótica y abiótica que éstas presentan (Snedaker y Snedaker, 1984; Hogarth, 1999).

Debido a todo lo anterior, se observa, que se presenta un efecto negativo de los HFP sobre la especie *A. germinans*, considerando esto, es pertinente señalar la importancia de evitar que los hidrocarburos derramados lleguen a este tipo de ecosistemas, ya que a pesar de tratarse, en este caso de un evento sucedido hace mas de 100 años, aún se presentan daños como producto de éste.

Los efectos de este tipo de contaminación, como ya se ha mencionado son múltiples (Olguín *et al.*, 2007), sin embargo, todos ellos pueden llevar a la alteración de las funciones propias del ecosistema, degradando significativamente tanto las funciones que poseen estos ecosistemas, así como la actividad comercial que se deriva de ellos, temas que ya han sido abordados en secciones anteriores.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1 Conclusiones

- Los individuos de *Avicennia germinans* en el Sitio Contaminado presentan valores significativamente menores de clorofila $a + b$, biomasa y superficie foliar, eficiencia fotosintética (Fv/Fm), índice de desempeño (PI), altura total y diámetro a la altura del pecho que los del Sitio Testigo.
- El suelo asociado a los individuos de *A. germinans* del Sitio Contaminado presenta valores significativamente mayores de hidrocarburos fracción pesada y salinidad que en el Sitio Testigo, mientras que el contenido de fósforo aprovechable fue menor en el Sitio Contaminado.
- No existen diferencias significativas en el contenido de nitrógeno total y pH del suelo entre el Sitio Contaminado y el Sitio Testigo.
- El contenido de clorofila no es un buen indicador ambiental de los efectos de los HFP sobre la especie *A. germinans*, ya que se presentó una baja correlación entre ambos parámetros.
- La eficiencia fotosintética (Fv/Fm) se propone como un buen indicador ambiental ya que su correlación respecto a los HFP es alta, es fácilmente medible y requiere bajos costos de inversión.
- Las concentraciones mostradas de nutrientes no son un factor limitante para el desarrollo de *A. germinans*, debido a que sus concentraciones estuvieron en niveles adecuados y además presentaron correlaciones bajas respecto a las variables de respuesta evaluadas.
- La salinidad mostró tener un efecto adverso sobre casi todas las variables cuantificadas, aunque no de forma significativa.
- La mezcla de hidrocarburos, representada por los HFP en el suelo produjeron un efecto adverso sobre todos los parámetros estructurales y fisiológicos evaluados en este trabajo para la especie de mangle *A. germinans*.

- El método no destructivo de cuantificación de clorofila (ICC medido con el equipo Opti-Sciences CCM-200) no puede ser utilizado como un sustituto del método destructivo tradicional de extracción con solución de acetona al 80% debido a que la correlación entre ambos métodos fue muy baja.

9.2 Recomendaciones

Mediante los resultados de este estudio es posible establecer que los HFP están teniendo un efecto negativo sobre el desarrollo de la especie *Avicennia germinans*, sin embargo, para una etapa posterior se recomienda realizar un estudio en laboratorio que permita establecer valores toxicológicos de referencia como la concentración o dosis máxima de efecto adverso no observado, o algún valor toxicológico similar.

Para lo anterior, sería necesario establecer un diseño de experimentos que permita tener control sobre las variables ambientales a las cuales se encontrarían sometidos los individuos de *A. germinans*, añadiendo cantidades conocidas de los hidrocarburos.

Los datos obtenidos a partir de la presente recomendación permitirían establecer concentraciones máximas de hidrocarburos a las que los árboles de *A. germinans* aún no presentan inhibiciones en su desarrollo, que, por las características de este trabajo, no fue posible determinar.

10. REFERENCIAS

-  Acuña F. 2006. Química orgánica. EUNED Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 373 p.
-  Alongi D.M. 1996. The dynamics of benthic nutrient pools and fluxes in tropical mangrove forests. *Journal of Marine Research*. 54:123-148.
-  Anand M.H. y Byju G. 2008. Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. *Photosynthetica*. 46(4):511-516.
-  Anderson V.L. y McLean R.A. 1974. Design of experiments. A realistic approach. Marcel Dekker Inc. Nueva York. 418 p.
-  ASTDR Agency for toxic substances and disease registry. 1999. Total petroleum hydrocarbons (TPH). ASTDR ToxFAQs. Recurso electrónico. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts123.pdf>
-  Bacon P.R. 1997. Wetlands and biodiversity. En: Hails A.J. (Ed.). *Wetlands, biodiversity and Ramsar Convention: The Role of the Convention on wetlands in the conservation and wise use of biodiversity*. Ramsar Convention Bureau. Suiza. 371 p.
-  Baker J.M. 1970. The effects of oils on plants. *Environm. Pollut.* 1(1):27-44.
-  Ball M.C., Butterworth J.A., Roden J.S., Christian R. y Egerton J.J.G.. 1994. Applications of chlorophyll fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22(2)311-319.
-  Barreiro M.T. y Signoret M. 1999. Productividad primaria en sistemas acuáticos costeros: Métodos de evaluación. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. México. 56 p.
-  Botello A.V., Rendón Von Osten J., Gold-Bouchot G. y Agraz-Hernández C. (Eds.). 2005. *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad

Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Universidad Istmo Americana, Gobierno del Estado de Veracruz, H. Ayuntamiento de Coatzacoalcos, Veracruz. México. 295 p.

 Boto K.G. y Wellington J.T. 1983. Phosphorus and nitrogen nutritional status of a northern Australian mangrove forest. *Marine Ecology – Progress Series*. 11:63-69.

 Boto K.G. y Wellington J.T. 1984. Soil characteristics and nutrient status in a northern Australian Mangrove Forest. *Estuaries*. 7(1):61-69.

 Bown H.E., Manson E.G., Clinton P.W. y Watt M.S. 2009. Chlorophyll fluorescence response of *Pinus radiata* clones to nitrogen and phosphorus supply. *Ciencia e Investigación Agraria*. 36(3):451-464.

 Bridgewater P.B. y Cresswell I.D. 1999. Biogeography of mangrove and saltmarsh vegetation: Implications for conservation and management in Australia. *Mangroves and Salt Marshes*. 3(2):117-125.

 Burns K.A., Codi S. y Duke N.C. 2000. Gladstone, Australia field studies: Weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. *Marine Pollution Bulletin*. 41(7-12):392-402.

 Burns K.A., Garrity S.D. y Levings S.C. 1993. Hoy many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills?. *Marine Pollution Bulletin*. 26(5):239-248.

 Calantzis C., Rivera-Becerril F., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. y Strasser R.J. 2000. Mycorrhiza buffer cadmium-induced stress in pea plants: vitality probing by fast fluorescence transient O-J-I-P. En: Abstracts of the SGPW/SSA-Workshop: Mycorrhiza and root research in Switzerland. Suiza.

- 📖 Cardona P. y Botero L. 1998. Soil characteristics and vegetation structure in a heavily deteriorated mangrove forest in the Caribbean Coast of Colombia. *Biotropica*. 30(1):24-34.
- 📖 Cassol D., De Silva F.S.P., Falqueto A.R. y Bacarin M.A. 2008. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. *Photosynthetica*. 46(4):634-636.
- 📖 Castelli F., Contillo R. y Miceli F. 1996. Non-destructive determination of leaf chlorophyll content in four crop species. *J. Agronomy y Crop Science*. 177, 275-283.
- 📖 Cintrón G.L., Lugo A., Pool D. y Moria G. 1978. Mangroves of arid environments in Puerto Rico and adjacent islands. *Biotropica*. 10(2):110-121.
- 📖 Cintrón G.L. y Schaeffer Y. 1982. Coral reef, seagrass beds and mangroves: Their interaction in the coastal zone of the Caribbean. UNESCO-IOCARIBE. París. 254 p.
- 📖 Cintrón G. y Schaeffer Y. 1983. Introducción a la ecología del manglar. UNESCO Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Montevideo. 100 p.
- 📖 Clark A.J., Landolt W., Bucher J.B., y Strasser R.J. 2000. Beech (*Fagus sylvatica* L.) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index. *Environmental Pollution*. 109:503-512.
- 📖 Clarck R.C. y Finley S. 1973. Techniques for analysis of paraffin hydrocarbons and for interpretation of data to assess oil spills effects in aquatic organisms. En: Proceedings of the 1973 joint conference on the prevention and control of oil spills. American Petroleum Institute. Nueva York. pp 161-173.
- 📖 Cochran W.G. y Cox G.M. 1991. Diseños experimentales. Editorial Trillas. México. 661 p.

-  CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2009. Manglares de México: Extensión y distribución. Segunda Edición. CONABIO. México. 99 p.
-  Contreras F. 1985. Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo de la Secretaría de Pesca. México. 253 p.
-  Corredor J.E., Morell J.M. y Del Castillo C.E. 1990. Persistence of spilled crude oil in a tropical intertidal environment. Marine Pollution Bulletin. 21(8):385-388.
-  Curtis H. y Barnes N.S. 2003. Biología. Editorial Médica Panamericana. España. 1491 p.
-  Dicks, B. 1986. Oil and the black mangrove *Avicennia marina* in the Northern Red Sea. Marine Pollution Bulletin. 17(11):500-503
-  DOF Diario Oficial de la Federación. 2002. NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. 31 de diciembre de 2002. México.
-  DOF Diario Oficial de la Federación. 2005. NOM-138-SEMARNAT/SSA-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. 29 de marzo de 2005. México.
-  DOF Diario Oficial de la Federación. 2006. Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. 30 de noviembre de 2006. México.
-  DOF Diario Oficial de la Federación. 2007. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. 19 de junio de 2007. México.
-  DOF Diario Oficial de la Federación. 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres –

Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. 30 de diciembre de 2010. México.

 Duke N.C. y Watkinson A.J. 2002. Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil-polluted sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 44:1269-1276.

 Duke N.C., Zuleika S., Pinzón M. y Prada M.C. 1997. Large-Scale damage to mangrove forests following two large oil spills in Panama. *Biotropica*. 29(1):2-14.

 Effiong G.S. y Ayolagha G.A. 2010. Characteristics, constraints and management of mangrove soils for sustainable crop production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*. 9(6):977-990.

 Ellison A.M. y Farnsworth E.J. 1996. Anthropogenic disturbance of Caribbean mangrove ecosystems: Past impacts, present trends, and future predictions. *Biotropica*. 28(4a):549-565.

 Elster C. 2000. Reasons for reforestation success and failure with three mangrove species in Colombia. *Forest Ecology and Management*. 131(1-3):201-214.

 EPA. Environmental Protection Agency. 2000. Analytical Method Guidance for EPA Method 1664A Implementation and Use. Febrero de 2000. Estados Unidos de Norteamérica.

 EPA. Environmental Protection Agency. 1998. Method 9071B. n-Hexane extractable material (HEM) from sludge, sediment and solid samples. Abril de 1998. Estados Unidos de Norteamérica.

 EPA. Environmental Protection Agency. 2011. Medios contaminados, salud humana y efectos ambientales. Recurso electrónico. Disponible en: http://www.epa.gov/superfund/spanish/health/efectos_ambientales.htm

-  Evans J., Fernández A., Gavilán A., Ize I., Martínez M.A., Ramírez P. y Zuk M. 2003. Introducción al análisis de riesgos ambientales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) e Instituto Nacional de Ecología (INE). México. 122 p.
-  FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007. The world's mangroves 1980 – 2005. FAO Forestry Paper. Reino Unido. 153:77 p.
-  FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2010. World Atlas of Mangroves. FAO. Reino Unido. 301 p.
-  Farnsworth E.J. y Ellison I. 1997. The global conservation status of mangroves. *Ambio*. 26(6): 328-334.
-  Field C.D. 1999. Rehabilitation of Mangrove Ecosystems: An Overview. *Marine Pollution Bulletin*. 37(8-12):383-392.
-  Gallegos M. 1986. Petróleo y manglar. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos. Centro de Ecodesarrollo. México. 102 p.
-  Glass D.J. 2006. Experimental design for biologists. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 206 p.
-  Graham R.L., Hunsaker C.T. y O'Neil R.V. 1991. Ecological risk assessment at regional scale. *Ecological Applications*. 1(2):196-206.
-  González S., Perales H., Salcedo M. 2008. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos del aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 27(4):117 – 129.
-  Gotelli N.J. y Ellison A.M. 2004. A primer of ecological statistics. Sinauer Associates, Inc. Estados Unidos. 479 p.
-  Gutiérrez E. 1985. Química. Editorial Reverté S.A. España. 500 p.

-  Hansatech Instruments. 2006. Operations manual: Handy PEA, Pocket PEA y PEA Plus. Reino Unido. Recurso electrónico. Disponible en: http://www.wittich.nl/C7F691D3-C1BC-4B63-BDC4-97134035F018/FinalDownload/DownloadId-2A3090CFDAD5D72C082C3725DF09972F/C7F691D3-C1BC-4B63-BDC4-97134035F018/NL/PDF/HANDLEIDINGEN/fotosynthese/chlorofylfluorescentie/manual_handypea-pocketpea.pdf
-  Haripriya M. y Byju G. 2008. Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. *Photosynthetica*. 46(4): 511-516.
-  Hawkins J.A., Sawyer J.E., Barker D.W. y Lundval J.P. 2007. Using relative chlorophyll meter values to determine nitrogen application rates for corn. *Agron. J.* 99:1034-1040.
-  Hesse P.R. 1961. Some differences between the soils of *Rhizophora* and *Avicennia* mangrove swamps in Sierra Leone. *Plant and Soil (XIV)*. 4:335-346.
-  Hogarth, P. 1999. *The Biology of Mangroves*. Oxford University Press. Oxford. 228 p.
-  Hunsaker C.T. y Carpenter D.E. (Eds). 1990. Environmental monitoring and assessment program: Ecological indicators. U.S. Environmental Protection Agency EPA. 143 p.
-  INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2011. Tipos de petróleo en México. Recurso electrónico. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/petroleo/tipos.aspx?tema=E>
-  IPIECA. International Petroleum Industry Environmental Conservation Association. 1991. Directrices sobre las consecuencias biológicas de la contaminación por hidrocarburos. Volumen 1. International Petroleum Industry Environmental Conservation Association. Reino Unido. 15 p.
-  Jackson J.B.C., Cubit J.D., Keller B.D., Batista V., Burns K., Caffey H.M., Caldwell R.L., Garrity S.D., Getter C.D., Gonzalez C., Guzman H.M., Kaufmann K.W., Knap

A.H. Levings S.C., Marshall M.J., Steger R., Thompson R.C. y Well E. 1989. Ecological effects of a major oil spill on Panamanian coastal marine communities. *Science*. 243(4887):37-44.

 Jiménez B. 2001. La contaminación ambiental en México. Editorial Limusa. México. 927 p.

 Jiménez J.A. y Lugo A.E. 2004. *Avicennia germinans*. US Department of Agriculture. Estados Unidos. Recurso electrónico. Disponible en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Avicenniagerminans.pdf>

 Kathiresan K. 2005. Methods of studying mangroves. En: K. Kathiresan y S.A. Khan (Eds.). International training course on mangroves and biodiversity. ONU – INWEH. Recurso electrónico. Disponible en: http://ocw.unu.edu/international-network-on-water-environment-and-health/unu-inweh-course-1-mangroves/Course_listing

 Klekowski E.J., Corredor J.E., Lowenfeld R., Klekowski E.H. y Morell J.M. 1994b. Using mangroves to screen for mutagens in tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin*. 28(6):346-350.

 Klekowski E.J., Corredor J.E., Morelli J.M. y Del Castillo C. 1994a. Petroleum pollution and mutation in mangroves. *Marine Pollution Bulletin*. 28(3):166-169.

 Krause G.H. y Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-349.

 Lewis R.R. 1983. Impact of oil spills on mangrove forests. En: Tees H.J. (Ed.). *Biology and ecology of mangroves. Tasks for Vegetation Science*. Estados Unidos. pp. 1147-183.

 Lugo A.E. y Snedaker C.S. 1974. The ecology of mangroves, En: R.F. Johnston, P.W. Frank y C.D. Michener. *Annual review of ecology and systematic*. Estados Unidos. 39-65.

-  Mackinney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* 140:315-322.
-  Marengo R.A., Antezana-Vera S.A. y Nascimento H.C.S. 2009. Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica.* 47(2):184-190.
-  Marwood C.A., Smith R.E.H., Solomon K.R., Charlton M.N. y Greenberg B.M. 1999. Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotoxicology and environmental safety.* 44(3):322-327.
-  Marwood C.A., Solomon K.R. y Greenberg B.M. 2001. Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 20(4):890-898.
-  MassDEP. Massachusetts Department of Environmental Protection. 2004. Interim final petroleum report: Development of health-based alternative to the total petroleum hydrocarbon (TPH) parameter. Recurso electrónico. Disponible en: <http://www.mass.gov/dep/cleanup/laws/alttph.pdf>
-  Mastandrea C., Chichizola C. y Ludueña B. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos, riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 39:27-36.
-  Maxwell K. y Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence: A practical guide. *Journal of Experimental Botany.* 51(35):659-668.
-  Menéndez L. y Guzmán J.M. (Eds.). 2006. Ecosistema de manglar en el Archipiélago Cubano: Estudios y experiencias enfocados a su gestión. Editorial Academia. Cuba. 329 p.
-  Montgomery D.C. 1997. Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons. Cuarta Edición. Estados Unidos de Norteamérica. 704 p.

-  Moreno P., Rojas J., Zárate D., Ortíz M., Lara A. y Saavedra T. 2002. Diagnóstico de los manglares de Veracruz. Distribución, vínculo de los recursos pesqueros y su problemática. *Madera y Bosques*, Número especial:61-68.
-  NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration. 2010. Oil spills in mangroves: Planning and response considerations. U.S. Department of Commerce. Estados Unidos de Norteamérica. 70 p.
-  Olgún E.J., Hernández M.E. y Sánchez-Galván G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23(3):139-154.
-  Opti-Sciences CCM-200. 2009. Chlorophyll Content Meter CCM-200. Recurso electrónico. Disponible en: http://www.apogeeinstruments.com/A684AB84-BC9B-40EC-9940-1EF75ACBEFDC/FinalDownload/DownloadId-B2054DADC6226FBC8B19670EF50B3/A684AB84-BC9B-40EC-9940-1EF75ACBEFDC/manuals/CCM_webmanual.pdf
-  Panda D., Dash P.K, Dhal N.K. y Rout N.C. 2006. Chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll content in mangrove species grown in different salinity. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 32(3-4):175-180.
-  Porta J., López-Acevedo M. y Roquero C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. España. 885 p.
-  Quiroga R. 2007. Indicadores ambientales y de desarrollo sostenible: Avances y perspectivas para América Latina y el Caribe. Naciones Unidas CEPAL. Chile. Recurso electrónico. Disponible en: <http://www.eclac.org/A684AB84-BC9B-40EC-9940-1EF75ACBEFDC/FinalDownload/DownloadId-CD509506647E2437DFE7B4F1ABFFC02C/A684AB84-BC9B-40EC-9940-1EF75ACBEFDC/deype/publicaciones/xml/4/34394/LCL2771e.pdf>
-  Ralph P.J. y Burchett M.D. 1998. Impact of photochemicals on the photosynthesis of *Hallophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Marine Pollution Bulletin*. 36:429-436.

- 📖 Rani S.S., Bragadeeswaran S., Prabina K. y Priyadharshini S. 2010. Inforestation of Barnacle (*Balanus amphitrite*) in the mangrove environment of Vellar Estuary, Tamilnadu. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 2(4):307-310.
- 📖 Richardson A.D., Duigan S.P. y Berlyn G.P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*. 153:185-194.
- 📖 Rivera-Monroy V.H., Twilley R.R., Medina E., Barry E., Botero L., Francisco A.M. y Bullard E. 2004. Spatial variability of soil nutrients in disturbed riverine mangrove forests at different stages of regeneration in the San Juna River Estuary, Venezuela. *Estuaries and Coasts*. 27(1):44-57.
- 📖 Rodés R. y Collazo M. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. UNAM: Facultad de Ciencias. México. 160 p.
- 📖 Rosas J.A. y Rodríguez N. 1997. Gasolinas. Octanaje. *Revista de la Franquicia PEMEX*. Volumen 11.
- 📖 Sanclemente M.A. y Peña E.J. 2008. Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (Onagraceae) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Acta Biológica Colombiana*. 13(1):175-186.
- 📖 Sanjuro E. y Welsh S. 2005. Una descripción del valor de los bienes y servicios ambientales prestados por los manglares. *Gaceta Ecológica*. 74:55-68.
- 📖 Smith R.L. y Smith T.M. 2001. *Ecología*. Addison Wesley. España. 664 p.
- 📖 Snedaker S.C. y Snedaker J.G. 1984. *The mangrove ecosystem: Research methods*. UNESCO. París. 251 p.
- 📖 Steubing L., Godoy R. y Alberdi M. 2002. *Métodos de ecología vegetal*. Universidad Austral de Chile, Colección Textos Universitarios. Chile. 347 p.
- 📖 Strasser R.J., Srivastava A. y Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En:

Yunus M., Pathre U. y Mohanty P. (Eds). Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation. Taylor and Francis. Reino Unido. pp. 445-483.

📖 Suprayogi B. y Murray F. 1999. A field experiment of the physical and chemical effects of two oils on mangroves. *Environmental and Experimental Botany*. 42:221-229.

📖 Takemura T., Hangata N., Sugihara K., Baba S., Karube I. y Dubinsky Z. 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. *Aquatic Botany*. 68:15-28.

📖 Tam N.F.Y. y Wong Y.S. 1998. Variations of soil nutrient and organic matter content in a subtropical mangrove ecosystem. *Water, Air and Soil Pollution*. 103:245-261.

📖 Tomlinson P.B. 1986. The botany of mangroves. Cambridge University Press. Cambridge. 413 p.

📖 Torres A., Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., González D.J., Razo I., Mejía J. y Díaz-Barriga F. 2005. Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. INE. México. 108 p.

📖 TPHCWG. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group. 1997. Development of fraction specific reference doses (RfDs) and reference concentrations (RfCs) for total petroleum hydrocarbons (TPH). Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series. Volume 4. Recurso electrónico. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/76742164/Tphcwg-Volume-4>

📖 Udding J., Gelang-Alfredsson J. y Piikki K. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth. Res.* 91:37-46.

📖 UNESCO Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. 1987. The Ramsar convention on wetlands. Canadá. Recurso

electrónico. Última actualización: 2011. Disponible en:
http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-documents-texts-convention-on/main/ramsar/1-31-38%5E20671_4000_2__

 Van Den Berg A.K. y Perkins T.D. 2004 Evaluation of a portable chlorophyll meter to estimate chlorophyll and nitrogen contents in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) leaves. *Forest Ecology and Management*. 200: 113-122.

 Wauquier J.P. 1994. El refinó del petróleo: Petróleo crudo, productos petrolíferos y esquemas de fabricación. Ediciones Technip. Francia. 426 p.

 Wayne R.M., Kroes R., Vieth G., Suter G.W., Damastra T. y Waters M.D. 2003. Approaches for integrated risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9(1):267-272.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1: Hojas de campo

11.1.1 Hoja de campo No. 1: Datos generales de la parcela



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ingeniería



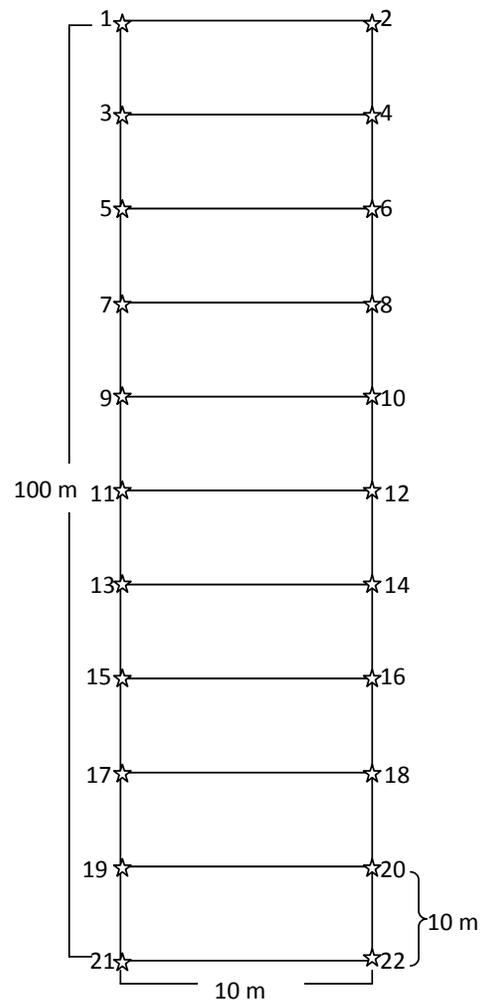
Hoja de campo No. 1
DATOS GENERALES DE LA PARCELA

Fecha: _____ Anotó: _____

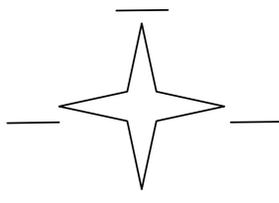
Sitio: _____ DATUM: _____

Nota: Se registran las coordenadas geográficas de todos los nodos (☆)

Punto	Coordenadas		Observaciones
	X	Y	
<u>1</u>			
<u>2</u>			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
<u>21</u>			
<u>22</u>			



Orientación:





Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ingeniería

Hoja de campo No. 2
Datos generales de los árboles



11.1.2 Hoja de campo No. 2: Datos generales de los árboles

Fecha _____ Sitio: _____

Anotó: _____

No. de árbol	Perímetro (cm)	Ángulo (°)	Coordenadas		Muestra de suelo	Observaciones
			X	Y		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						

11.1.3 Hoja de campo No. 3: Muestras foliares



Universidad Nacional Autónoma de México
 Instituto de Ingeniería

Hoja de campo No. 3
MUESTRAS FOLIARES



Fecha _____ Sitio: _____

Anotó: _____

No. de árbol	No. de hoja	Estrato (alto, medio o bajo)	Índice de Contenido de Clorofila (ICC)		Observaciones



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ingeniería

Hoja de campo No. 4
Extracción de pigmentos fotosintéticos



11.1.4 Hoja de campo No. 4: Extracción de pigmentos fotosintéticos

Fecha _____ Sitio: _____ Anotó: _____

No. de árbol	No. de hoja	Absorbancia			Observaciones
		440 nm	645 nm	663 nm	

11.1.6 Hoja de campo No. 6: Fluorescencia de la clorofila



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ingeniería



Hoja de campo No. 6
Fluorescencia de la clorofila Fecha: _____ Sitio: _____

Árbol: _____				
Hoja	Archivo	Fm/Fv	PI	Observaciones
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Árbol: _____				
Hoja	Archivo	Fm/Fv	PI	Observaciones
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Árbol: _____				
Hoja	Archivo	Fm/Fv	PI	Observaciones
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

11.1.8 Hoja de campo No. 8: Superficie foliar



Universidad Nacional Autónoma de México
 Instituto de Ingeniería



Hoja de campo No. 8
Superficie foliar

Fecha: _____ . Sitio: _____

Árbol: _____		
Hoja	Peso fresco (gr)	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Árbol: _____		
Hoja	Peso fresco (gr)	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Árbol: _____		
Hoja	Peso fresco (gr)	Observaciones
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		