



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**EL PASTO MARINO (*Thalassia testudinum*)
COMO BIOINDICADOR EN SITIOS
AMBIENTALMENTE SENSIBLES A
DERRAMES DE HIDROCARBUROS**

Tesis que presenta
Arellano López Isidro
Para obtener el grado de:
Maestro en ciencias (Energía Y Medio Ambiente)

Directora

Dra. Patricia Ramírez Romero

Co-directora

Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez

Asesor

Dr. Héctor Ocampo Álvarez

Jurado calificador:

Presidente:

Dr. Alejandro Federico Alva Martínez

Secretaria:

Dra. Margarita Elizabeth gallegos Martínez

Vocal:

M. en C. Alma Delia Nava Montes

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2017

AGRADECIMIENTOS

La Maestría en Ciencias (Energía y Medio Ambiente) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 003893; por lo que agradezco la beca recibida para el desarrollo de esta tesis, con el No. de becario: 574989.

La toma de muestras, compra de materiales y reactivos se pudo hacer gracias al apoyo recibido de los proyectos:

- 1) “Fortalecimiento de la línea base del Golfo de México: indicadores del estado de salud de las comunidades de pastos marinos de la reserva de la biosfera Los Petenes, Campeche”, convenio de la UAM y el INECC/SEMARNAT.
- 2) “Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental”, aprobado por el consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa (2015-2018).

Al Laboratorio de Ecotoxicología, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Al Laboratorio de Pastos Marinos y Bentos, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Al laboratorio de Membranas Biológicas, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Mi especial agradecimiento por el apoyo académico brindado a mis co-directoras, asesor e integrantes del jurado calificador: **Dra. Patricia Ramírez Romero, Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez, Dr. Héctor Ocampo Álvarez, Dr. Alejandro Federico Alva Martínez, y M. en C. Alma Delia Nava Montes**, quienes además de sus valiosos conocimientos y comentarios, dedicaron su valioso tiempo para ayudarme en mi desarrollo profesional.

Agradezco el apoyo de aquellas personas que me brindaron sus asesorías y accesos a equipos y materiales, como la, **Dra. Guadalupe Barrera Escorcía, y Dra. Guadalupe Miranda Arce** y el **Dr. José Luis Gómez Olivares**.

Agradezco a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Ecotoxicología, por su apoyo y ayuda en todo momento, su compañía ha sido muy enriquecedora para mí vivir.

A mis amigos con los que curse la maestría. Sin ustedes este camino no hubiera sido el mismo, agradezco formar parte de esta generación de excelentes personas, de las cuales aprendí mucho y atesoro sus enseñanzas.

DEDICATORIA

A mi esposa Laura, por alegrar mi vida, por su apoyo incondicional, su paciencia y por caminar a mi lado este camino lleno de sueños por cumplir.

A mi amado hijo, Isidro Daniel, por llegar a mi vida y enriquecerla con su presencia.

A mi madre, por enseñarme a enfrentar cualquier obstáculo.

A mi padre, porque sus consejos me acompañarán por siempre.

A mis hermanos Lucio, Luis y Ernesto, porque siempre han estado para apoyarme, escucharme y para ser mis grandes maestros y amigos.

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco Teórico	7
2.1 Sitios sensibles a derrames de hidrocarburos	7
2.2 Pastos marinos.....	9
2.3 Bioindicador.....	11
2.4 Biomarcadores	12
2.4.1 Actividad fotosintética	13
2.4.2 Lipoperoxidación	15
2.4.3 Azúcares	17
2.4.4 Compuestos fenólicos	17
3. Pregunta de investigación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivo general	20
5.1 Objetivos específicos.....	20
6. Área de Estudio.....	21
7. Metodología.....	25
7.1 Metodología de campo	26
7.2 Metodología de laboratorio	27

7.2.1 Cuantificación de clorofilas	28
7.2.2 Determinación de proteínas.....	28
7.2.3 Determinación de lipoperoxidación.....	29
7.2.4 Cuantificación de azúcares totales.	30
7.2.5 Determinación de fenoles.	30
7.2.6 Construcción de mapas de isolíneas.	31
8. Análisis estadístico	32
8.1 Estadística paramétrica	32
8.2 Estadística no paramétrica	33
8.2.1 Biomarcadores	33
9. Resultados y discusión.....	35
9.1 Parámetros fisicoquímicos.....	35
9.1.2 Promedios generales para toda la zona de estudio.....	35
9.2 Comparaciones por temporada.....	36
9.2.1 Temperatura	36
9.2.2 Salinidad.....	38
9.2.3 Oxígeno disuelto.....	39
9.2.4 Potencial de hidrogeno	41
9.2.4 Potencial redox	42
9.3 Biomarcadores (Interpretación vía estadística paramétrica).	44
9.3.1 Promedios generales para cada temporada	44
9.3.2 Comparaciones de biomarcadores por temporada	46

Clorofila a	46
Clorofila b	47
Clorofilas totales	49
Relación de clorofilas a/b	50
Proteínas	52
Lipoperoxidación	53
Azúcares	55
Fenoles	56
9.4 Pruebas de correlación entre biomarcadores y factores ambientales	58
10. Resultados de análisis multivariado no paramétricos	60
10.1 Resultados de los biomarcadores	60
10.2 Resultados de las variables ambientales	62
11. Conclusiones	65
12. Recomendaciones	66
13.	
Bibliografía	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de alto riesgo para accidentes petroleros en el área del Gran Caribe	8
Figura 2. Estructuras vegetativas de <i>Thalassia testudinum</i>	11
Figura 3. Modelo conceptual de la reducción de la luz y el impacto sobre el pasto.....	15
Figura 4. Reserva de la Biosfera Los Petenes	21
Figura 5. Ubicación Geográfica de la Reserva de la Biosfera Los Petenes y sitios de muestreo.....	23
Figura 6. Corrientes marinas del Golfo de México	24
Figura 7. Diagrama de metodología.....	25
Figura 8. Área y sitios de muestreo ubicados dentro de la Reserva de la Biosfera Los Petenes.	26
Figura 9. Equipo utilizado en campo	27
Figura 10. Equipo utilizado para homogenizar	28
Figura 11. Muestras de extracción de clorofilas	28
Figura 12. Extracción de proteínas	29
Figura 13. Micropipeta de repetición	29
Figura14. Equipo utilizado para medir proteínas totales	29
Figura 15 . Reactivo para la determinación de lipoperoxidación, ácido tiobarbitúrico.....	29
Figura 16. Extracciones hechas para medir lipoperoxidación.....	29
Figura 17. Equipo utilizado para centrifugar los extractos	30
Figura 18. Extracción de azúcares totales	30
Figura 19. Fenoles extraídos de las muestras de pasto marino	31
Figura 20. Colores para las isólineas obtenidos del programa Ocean Data View.	31
Figura 21. Resultados de temperatura	36
Figura 22. Isólineas de temperatura	37
Figura 23. Salinidad	38

Figura 24. Isolíneas de salinidad	39
Figura 25. Oxígeno disuelto	40
Figura 26. Isolíneas de oxígeno disuelto	41
Figura 27. Potencial de hidrogeno	41
Figura 28. Isolínea de potencial de Hidrogeno	42
Figura 29. Potencial Redox	43
Figura 30. Isolíneas de Potencial Redox	43
Figura 31. Clofofila a	46
Figura 32. Isolínea de Clorofila a	47
Figura 33. Concentraciones de clorofila b mg/g	48
Figura 34. Isolíneas de clorofila tipo b.....	48
Figura 35. Clorofila total mg/g.....	49
Figura 36. Isolíneas de clorofilas totales	50
Figura 37. Relación de Clorofilas a/b (mg/mol)	51
Figura 38. Isolíneas de Clorofila a/b.....	51
Figura 39. Proteínas mg/g	51
Figura 40. Isolínea de proteínas	53
Figura 41. Concentración de lipoperoxidación MDAnmol/mgproteína	54
Figura 42. Isolíneas de lipoperoxidación.....	54
Figura 43. Azúcares totales mg/g.....	55
Figura 44. Isolómeas de azúcares	56
Figura 45. Concentración de fenoles mg/g.....	57
Figura 46. Isolíneas de fenoles	57
Figura 47. Análisis de componentes principales	60
Figura 48. Análisis de componentes principales de parametros fisicoquímicos	62
Figura 49. Comparación visual de la distribución de los biomarcadores	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedios de los parámetros fisicoquímicos en secas, lluvias y nortes.....	36
Tabla 2. Resultados de biomarcadores en tres épocas del año	45
Tabla 3. Correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y los biomarcadores.....	59
Tabla 4. Componentes principales.....	61
Tabla 5. Componentes principales de las variables ambientales	63

Resumen

Una de las principales zonas de extracción y producción de petróleo en nuestro país, es La Sonda de Campeche, donde se encuentra la Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP), en la cual se encuentra la mayor y mejor conservada superficie de pastos marinos del país; así este ecosistema corre el riesgo de ser impactado por derrames de petróleo. El objetivo del presente trabajo fue establecer una línea base de calidad ambiental en la RBLP, a través de la medición de biomarcadores (concentración de clorofila, fenoles, carbohidratos y lipoperoxidación) en el pasto *Thalassia testudinum* (Tt). Se hicieron tres muestreos durante el año 2015 para cubrir las diferentes estacionalidades, con 18 sitios de muestreo. Los biomarcadores mostraron que la temporada de lluvias representa el mayor estrés para los pastos marinos *Thalassia testudinum*, lo cual en parte es resultado del aumento en los sólidos disueltos que provocan una disminución de la penetración de la luz en la columna de agua, lo que disminuye la eficiencia fotosintética. Los sitios cercanos a la ciudad de Campeche muestran con frecuencia que los pastos marinos se encuentran bajo la influencia de algún factor de estrés adicional, por lo que se recomienda un monitoreo más intensivo en éstas áreas y la identificación de las fuentes de contaminantes. Los menores niveles de estrés en los pastos marinos se presentan en la época de secas, donde las concentraciones de fenoles y azúcares son bajas con excepción de los sitios cercanos a la ciudad de Campeche. Los valores de los biomarcadores medidos en este estudio, conforman una línea base que podrá ser de utilidad para evaluar otros factores de estrés como la presencia de hidrocarburos en caso de que ocurra un derrame y estos contaminantes alcancen la zona de pastos marinos cuya importancia ecológica es fundamental por toda la gama de servicios ecológicos que representa (producción de oxígeno, regulación del ciclo del carbono, zona de crianza de muchas especies, retención de sólidos, protección de la zona costera entre otros).

Abstract

One of the main areas of oil extraction and production in our country is La Sonda de Campeche, where the Los Petenes Biosphere Reserve (RBLP) is located, which contains the largest and best conserved sea grasses area of the country; therefore this ecosystem runs the risk of being impacted by oil spills. The objective of the present work was to establish a baseline of environmental quality in the RBLP, through the measurement of biomarkers (concentrations of chlorophyll, phenols, carbohydrates and lipoperoxidation) in *Thalassia testudinum* (*Tt*). Three sample collections were carried out during the year 2015 to cover the different seasons, with 18 sampling sites. Biomarkers showed that the rainy season represents the greatest stress for the sea grass *Thalassia testudinum*, which is partly a result of the increase in dissolved solids causing a decrease in light penetration in the water column, which decreases photosynthetic efficiency. Sites close to the city of Campeche often showed that sea grasses are under the influence of some additional stress factor, so more intensive monitoring is recommended in these areas and identification of sources of pollutants. The lowest levels of stress in sea grasses occur in the dry season, where the concentrations of phenols and sugars are low, except for sites near the city of Campeche. The values of the biomarkers measured in this study form a baseline that will be useful to evaluate other stressors such as the presence of hydrocarbons in the event of an oil spill in which these contaminants reach the marine grasses, which are ecologically important for many reasons (oxygen production, regulation of the carbon cycle, breeding zone for many species, retention of solids, protection of the coastal zone, among others).

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es un recurso natural no renovable de amplio uso industrial, México es uno de los pocos países en el mundo que cuenta con yacimientos de hidrocarburos que son suficientes para cubrir las necesidades energéticas y económicas del país, sin embargo, existe un gran riesgo de accidentes; en los 90s se estimaba que alrededor del 0.2% de la producción mundial de petróleo terminaba en el mar, lo que representa cerca de 3 millones de toneladas por año (Echarri, 1998).

Una de las principales zonas donde se produce petróleo y gas en México se ubica en la parte sur del Golfo de México, se trata de la Sonda de Campeche, donde en la actualidad se genera el 82% de la producción total nacional de crudo (IMP, 2001) (PEMEX, 2003). Las diversas actividades que son llevadas a cabo por Petróleos Mexicanos (PEMEX), como los procesos de exploración, producción, transporte, almacenamiento y oleoductos, implican una gran posibilidad de que pudieran existir diversos impactos de contaminación por hidrocarburos en el ambiente marino (García-Cuellar *et al.* 2004).

Aunado a lo anterior, podrían existir otras fuentes aportadoras de hidrocarburos que incidan en el área como son: descargas industriales y municipales que alcanzan el área por vía de escurrimientos de ríos y descargas costeras, producción biológica in situ, deposiciones atmosféricas, emanaciones crónicas, discretas, así como la intensa actividad de botes pesqueros y comerciales (Botello *et al.* 1992). De ahí que, todas las fuentes conocidas y estimadas de aportaciones de petróleo en el mar ocurren y, potencialmente contribuyen a la carga de hidrocarburos en el Golfo de México.

La Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP) se localiza en el estado de Campeche, la cual fue decretada el 24 de mayo de 1999 en el Diario Oficial y cuenta con su Programa de Manejo publicado el 22 de abril del 2009. Desde principios de los ochentas se han desarrollado trabajos enfocados a su protección, conservación y uso sostenible de los ecosistemas y recursos naturales; esto, debido a la gran importancia que tiene su biodiversidad (CONANP, 2006). En 1996 se generaron

estudios técnicos por parte de la Universidad Autónoma de Campeche, para sustentar su decreto como área natural protegida.

La RBLP presenta poco deterioro ambiental, estimado en 30 % de toda su superficie. La densidad de población humana es mínima tanto dentro del área como en su zona de influencia, adicionalmente, dicha Reserva contiene la mayor y mejor conservada superficie de pastos marinos del Golfo de México (CONANP-SEMARNAT, 2006).

Los pastos marinos son un recurso natural de gran importancia debido a la gran cantidad de servicios ambientales que proporcionan (Daranas, 2007), entre los cuales destacan:

- Promover diversidad biológica: por la alta tasa de producción primaria de las angiospermas y de las algas asociadas, de modo que producen oxígeno y regulan el ciclo global del carbono.
- Zonas de cría: como resultado de su productividad y de su complejidad estructural, incrementan la diversidad de hábitats y de especies ya que dan vida y sustento a diversas poblaciones (RAMSAR, 2003).
- Mejorar la calidad del medio marino: amortiguan el oleaje y retienen los sólidos suspendidos en el agua, mejorando su transparencia. Las angiospermas y algas asociadas absorben los nutrientes del agua y los sedimentos, actuando como filtros.
- Protección de la zona costera: las hojas y el sistema radicular de las angiospermas favorecen la estabilización de los sedimentos y reducen su resuspensión, protegiendo a las costas contra la erosión y a los arrecifes coralinos contra la sedimentación excesiva. La acumulación de hojas en las playas disipa la energía de las olas y retienen los sedimentos. Son fuente de sedimentos producto de los esqueletos carbonatados de los organismos que viven en ellos (Fernández *et al.* 2004).
- Los pastos marinos son un excelente bioindicador pues cuentan con una amplia distribución, presentan resistencia a algunos contaminantes; se ha

demostrado su capacidad para acumular contaminantes y han sido usados en diversas ocasiones como indicadores de la calidad del ambiente y de respuestas a situaciones de estrés, además han sido utilizados en bioensayos para la evaluación de su estado de salud a través de biomarcadores (Álvarez-Legorreta *et al.* 2008).

Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos, ocasionadas por la exposición a contaminantes y, en general, estas respuestas son rápidas, sensibles y, en ocasiones, son reacciones específicas de los organismos a los contaminantes (Botello, 2005).

De acuerdo con Cajaraville *et al.* (2003) pueden interpretarse como "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante".

El presente trabajo utilizó como biomarcadores en los pastos marinos la concentración de clorofila, fenoles, proteínas y carbohidratos, así como la lipoperoxidación medida como malonaldehído para establecer una línea base de estas respuestas en la RBLP.

Estos biomarcadores se han utilizado con gran éxito en pastos marinos para evaluar su estado de salud. Por ejemplo, la evaluación de las clorofilas permite medir el estrés causado por las actividades antropogénicas, ya que dicho estrés causa una baja en la eficiencia de los fotosistemas, disminución en la fijación de CO₂, pérdida del uso eficiente del agua, entre otras. El contenido de clorofila se ha correlacionado con diversas condiciones ambientales como la intensidad lumínica, la temperatura, la humedad relativa, presencia de plagas, densidad de población, fuente de nitrógeno, entre otras (Solarte *et al.* 2005).

Así también, las reservas de carbohidratos juegan un papel importante en la resistencia de las plantas ante las perturbaciones, al servir como un "mecanismo de rescate" (Chapin *et al.* 1990). Los pastos marinos tienen una red de rizomas (órganos de almacenamiento) que se localizan por debajo del subsuelo, estas estructuras sirven como reservas de carbohidratos para el crecimiento de la planta y su sobrevivencia durante los períodos de baja capacidad fotosintética. Debido a la acumulación de estas reservas, los pastos marinos, bajo una situación de estrés, mostrarán mayor contenido de carbohidratos en los tejidos de las hojas (Cambell, 2012).

Las plantas responden a variaciones ambientales, como las ocasionadas por la época del año, la fertilización y los daños causados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios (Strack, 1997). Los fenoles son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica de los carbohidratos formados durante la fotosíntesis, una parte se emplearán en la conformación estructural de la planta (metabolismo primario) y otros en el metabolismo secundario, lo que tendrá una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos (Pérez, 2014).

La lipoperoxidación es un proceso complejo que se produce en plantas y animales debido a la presencia de radicales libres de oxígeno, que al generar la peroxidación en los organelos que cuentan con membranas lipídicas, como lo son el retículo endoplásmico, la mitocondria y los lisosomas, culmina en la eventual destrucción de dichas membranas lipídicas, produciendo además una variedad de productos de degradación, como son los aldehídos (Buege y Aust, 1978).

Debido a la cercanía que presenta el área de estudio con la sonda de Campeche se puede decir que, es un área sensible a sufrir derrames de hidrocarburo, por lo que es importante conocer el estado de salud de los pastos marinos *Talassia testudinum* y, las respuestas de los biomarcadores pueden aportar información muy importante con respecto a su estado actual.

2. MARCO TEORICO

2.1 Sitios sensibles a derrames de hidrocarburos

La producción y extracción de petróleo para satisfacer nuestras necesidades ha ocasionado que la contaminación por este recurso sea cada vez mayor y sea una problemática a nivel mundial, ya que existe un gran riesgo de accidentes debido a las operaciones de extracción, refinación, transporte, almacenamiento y uso de hidrocarburos como principal fuente de energía (Botello, 2005).

Uno de los principales accidentes que se ha presentado en el Golfo de México, es el del Pozo Ixtoc-I en las costas de Campeche, en el cual se derramaron más de 3, 100,000 barriles de crudo (Botello, 2005). Actualmente sabemos que las zonas de extracción, producción y uso no son las únicas vinculadas a los aportes de este contaminante en los ecosistemas marinos, sino que también existe filtraciones naturales desde el fondo del océano, la movilización de las corrientes marítimas representa un transporte, así como las descargas de aguas residuales (municipales e industriales) y los puertos (Atwood *et al.* 1988).

El Golfo de México es una de las regiones mas grandes de produccion de petróleo en el mundo, por lo que está considerada como zona de alto riesgo en cuanto a accidentes causados por derrames de petróleo (Figura 1), se calcula una producción de mas de 3 millones de barriles por día de los cuales el 75% proviene de la Sonda de Campeche, movilizados por ductos submarinos con diversos destinos, como lo son bollas flotantes, puertos de almacenaje, transformación y refinación, originando un sitio propenso a sufrir las afectaciones que traen consigo las actividades ya mencionadas (Botello, 2005).

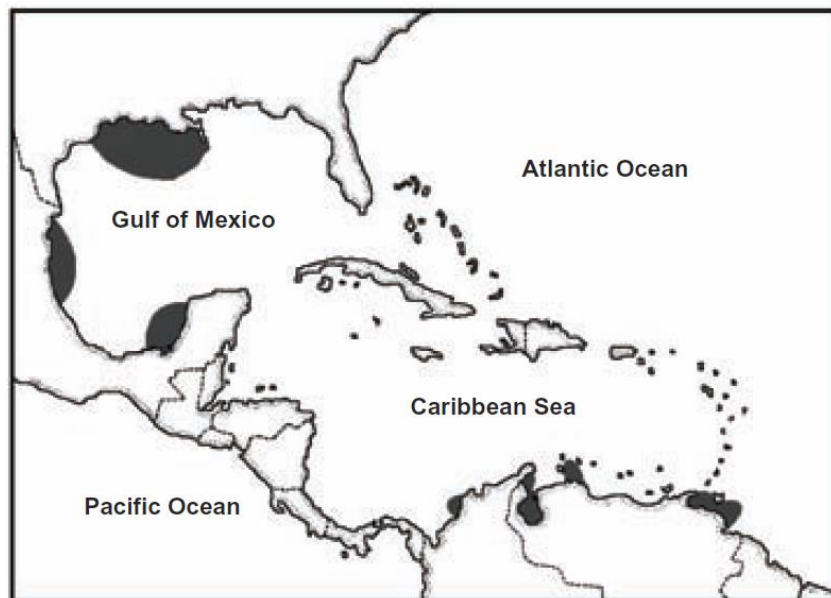


Figura 1. Zonas de alto riesgo para accidentes petroleros en el área del Gran Caribe (Tomado de: Botello, 2005)

Debido a la intensa actividad petrolera ya mencionada, la contaminación por hidrocarburos es una de las problemáticas principales en el Golfo de México y esto hace que sitios cercanos a estas zonas de extracción, principalmente a la Sonda de Campeche, sean sensibles a ser afectados por derrames, esto podría haber expuesto a los ambientes cercanos a factores estresantes que podrían implicar impactos en los ecosistemas de la región.

El presente trabajo se realizó en el estado de Campeche, debido a la relevancia ecológica que tiene la Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP), ubicada en este estado. La RBLP se encuentra reconocida por el Programa de Regiones Prioritarias para la Conservación de la Biodiversidad de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), considerada como: Región Terrestre prioritaria, Región Marina Prioritaria, Región Hidrológica Prioritaria y Áreas de Importancia para la Conservación de Aves (CONABIO, 2006).

En la RBLP se encuentra la pradera de pasto marino más grande de México, por lo que su importancia ecológica y los servicios ambientales que genera son relevantes (CONANP, 2003). Por lo que es importante generar un diagnóstico de éste sitio con el fin de conocer el estado de salud de los pastos marinos y su posible respuesta ante un derrame de hidrocarburos.

2.2 Pastos marinos

Los pastos marinos son plantas angiospermas, que se encuentran sumergidos en ambientes marinos, tienen hojas, tallos, raíces, rizomas, flores, frutos y semillas. Pertenecen a las Alismataceae, con aproximadamente 60 especies de pastos marinos en el mundo (Van Tussenbroek *et al.* 2015), aunque en las costas de México se reportan seis géneros. En el Golfo de México se desarrollan *Thalassia testudinum*, *Halodule beaudettei*, *Halodule wrightii*, *Syringodium filiforme*, *Halophila decipiens*, *Halophila engelmannii* y *Ruppia maritima* (den Hartog y Kuo, 2006).

Los pastos marinos son grandes productores primarios, y muchos animales marinos dependen directa o indirectamente de estos. Sus estructuras físicas forman un sistema tridimensional que constituye un área de desove y funciona como estabilizador y reten natural de arena. Las hojas disminuyen el oleaje y las corrientes, lo que permite una rápida sedimentación de granos de arena, lodos y materia orgánica disminuyendo la erosión de las playas. Otra función de los pastos marinos es la de servir como hábitat para múltiples organismos, al mismo tiempo que las hojas les permiten ocultarse de sus depredadores. Las hojas sirven como sustrato para plantas y animales sésiles. Sirven como áreas de crianza para las etapas juveniles de peces. Finalmente, los pastizales marinos, en conjunto con los manglares y las marismas intermareales, son importantes sumideros marinos de carbono, mitigando los efectos del cambio climático global, todos estos servicios ambientales que proveen los pastos marinos han sido subestimados posiblemente debido a su poca estética y su alta producción de materia orgánica (Orth *et al.* 2006).

Las praderas de pastos marinos han sido señaladas como importantes almacenes de carbono, aunque solo ocupan el 0.2% del área de los océanos a nivel mundial se estima que almacenan 27.4 TC/año, que es el 10% del carbono capturado en los océanos (Nellemann *et al.* 2009). La acumulación de carbono en los sedimentos asociados a las praderas marinas ofrece un almacén a largo plazo de carbono orgánico y se le conoce como “carbono azul”. Sin embargo, las praderas de pastos marinos están teniendo una disminución en su cobertura de hasta un 5% al año, esta disminución es asociada principalmente a causas antropogénicas, incluyendo un decremento en la calidad del agua y el incremento de la temperatura del agua (Orth *et al.* 2006). La pérdida de cobertura de las praderas marinas repercute en la liberación de la gran cantidad de carbono almacenado en los sedimentos asociados a las praderas marinas (Duarte *et al.* 2005).

Los pastos marinos crecen en fondos arenosos y lodosos hasta una profundidad de 50 m., pero en el caso de *Thalassia testudinum* ha sido encontrada a no más de 15m. Su distribución está limitada principalmente por factores físicos y químicos, tales como las mareas, las fuerzas hidrodinámicas, la salinidad, la luz y los nutrientes (Lara-Domínguez *et al.* 1999).

De acuerdo con Van Tussenbroek (2015), las características de *Thalassia testudinum* son las siguientes: cuenta con hojas en forma de cinta de color verde y tiene un largo entre 10 y 80 cm, un ancho entre 0.5 y 2 cm, la vaina de la base es semitransparente y el ápice de la hoja madura es redondeado con un borde serrado. Sus rizomas son gruesos, con múltiples escamas, terminando en un ápice agudo. Las raíces son gruesas, de color blanco a gris y sin ramificaciones y tienen una reproducción sexual. En la Figura 2 se muestran las partes de este ejemplar del pasto marino.

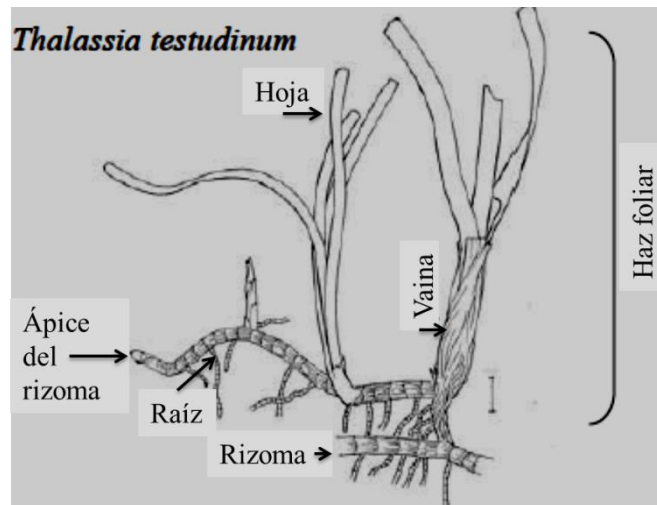


Figura 2. Estructuras vegetativas de *Thalassia testudinum*, (tomado de Van Tussenbroek, 1995)

El uso de estos organismos como bioindicadores constituye una herramienta de gran importancia para la investigación ecológica. Mediante el uso de biomarcadores sus respuestas han ayudado a fomentar su uso en el diagnóstico ambiental (Ferrat, *et al.* 2003).

2.3 Bioindicador

Algunos organismos pueden proporcionar información de cambios físicos y químicos en el agua, ya que a lo largo del tiempo revelan modificaciones en la composición de su comunidad, además determinan los efectos de los impactos en los ecosistemas acuáticos (Ferrat *et al.* 2003).

El concepto de bioindicador se refiere a especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia a varios parámetros. Usualmente se emplean bioindicadores de contaminación debido a su especificidad y fácil monitoreo, la presencia de una especie en particular, que demuestra la existencia de ciertas condiciones en el medio, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones (Odum, 1972).

Según Vázquez *et al.* (2006), las ventajas del uso de bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del medio son:

- Las comunidades biológicas reflejan las condiciones del sistema (física, química, biológica y ecológica)
- Los monitoreos son más económicos que los hechos con análisis fisicoquímicos en laboratorios.
- La información generada puede utilizarse mediante escalas numéricas

Debido a que las plantas en general presentan diversas respuestas fisiológicas, biológicas, bioquímicas, así como mecanismos de adaptación o mortalidad, han sido utilizadas para diagnósticos o predicciones de impactos por actividades antropogénicas (Vangronsveld *et al.* 1998). Estos organismos vegetales son sedentarios, sensibles a las variaciones ambientales, así como el primer eslabón en la cadena alimenticia, por lo que reaccionan más rápidamente ante los efectos adversos, que los organismos que viven en ellos (Ferrat *et al.* 2003).

Los pastos marinos han sido utilizados como bioindicadores, principalmente en la identificación de ambientes marinos bajo estrés relacionado con luz, temperatura, estrés hídrico, herbicidas, metales y contaminantes orgánicos. Sus respuestas ante estas situaciones han sido utilizadas principalmente como biomarcadores de actividad fotosintética, procesos enzimáticos de nutrición, síntesis de metabolitos secundarios y estrés oxidativo (Ferrat *et al.* 2003).

2.4 Biomarcadores

Existen diversos factores de estrés en el ambiente, los cuales pueden ser debidos a actividades antropogénicas, variabilidades ambientales o factores naturales. La complejidad de los ecosistemas acuáticos junto con su alta variabilidad y la influencia de múltiples factores estresantes, imposibilitan el uso únicamente de los criterios para estimar los efectos de la calidad del agua sobre los ecosistemas pues se podría obtener un fundamento incompleto. Así, algunos criterios biológicos poseen algunos atributos deseables para estimar los efectos de factores

ambientales y ayudar a entender las bases de estos efectos sobre el ecosistema (Rendón, 2005). Los biomarcadores, no solo reflejan la exposición química, sino que tienen la capacidad de integrar muchos de los factores físicos, químicos y biológicos que operan en el sistema.

Los biomarcadores son efectos, respuestas o alteraciones que pueden ser cuantitativas o cualitativas, ocasionadas por la exposición a contaminantes. Estas pueden ser bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos (SRNT, 1989).

El presente estudio se enfocó en hacer uso de algunos biomarcadores (actividad fotosintética, metabolitos secundarios, y de estrés oxidativo) como una herramienta clave para identificar la presencia de estrés y su impacto en los pastos marinos.

2.4.1 Actividad fotosintética

La abundancia y distribución de las plantas está relacionada con la cantidad de luz disponible y la fotosíntesis de estas (Ferrat *et al.* 2003). La fotosíntesis comprende dos reacciones globales diferenciadas: en la primera se realiza la transducción de energía, se transfiere la energía hacia el centro de reacción y los que conforman este centro que constituyen un tipo particular de moléculas de clorofila (Chl a P680 y Chl a P700) llevan a cabo la reacción fotoquímica y, en la segunda, la reacción global de la fotosíntesis se lleva a cabo la reducción y fijación del carbono; también se induce una transferencia de electrones donde el agua es un donador propiciando la liberación de O₂ como bioproducto (Solarte *et al.*, 2005).

La luz necesaria para la fotosíntesis debe penetrar en la columna de agua hasta llegar a las hojas; sin embargo, ésta es atenuada por factores externos como la profundidad, materia orgánica disuelta, incremento de nutrientes (eutrofización), escorrentías, florecimientos algales, tormentas y modificaciones en los patrones de lluvia (Ralph *et al.* 2007).

Los organismos fotosintéticos presentan plasticidad en sus respuestas a las variaciones ambientales. Las plantas y algas adaptadas a hábitats caracterizados por amplios rangos de variación espacial y/o temporal tienden a presentar una predisposición a la aclimatación fotosintética, es decir, respuestas al cambio ambiental, permitiéndoles compensar fisiológicamente grandes cambios, por ejemplo, Dunton (1997) observó cambios tanto en las concentraciones de pigmento como en las relaciones Chl a/b con respecto a los cambios en la irradianza, concluyendo que la plasticidad se ve afectada en el periodo de aclimatación, causando la disminución de las praderas de pastos marinos.

El estrés provocado por las condiciones ambientales o actividades antropogénicas puede afectar la fotosíntesis. Según, (2005) el fotodaño de los cloroplastos es la respuesta principal y común de todos los factores de estrés que operan en condiciones de campo en presencia de luz, entonces el cloroplasto es considerado como el blanco del estrés ambiental. El estudio de los pigmentos es importante ya que aporta información sobre productividad y eventos de estrés. La clorofila a se puede convertir en clorofila b mediante la oxigenación enzimática activada por la clorofila a monooxigenasa (CAO). En ocasiones la biosíntesis de clorofila a se puede ver inhibida, mientras que, en otros casos, la clorofila b puede reconvertirse en clorofila a vía 7-hidroximetil clorofila a por las enzimas clorofila b reductasa y 7 hidroximetil clorofila a reductasa (Solarte *et al.* 2005).

La reducción de luz causa disminución en la densidad del cloroplasto, aumento del contenido de clorofila b y, por consecuencia disminución de la relación clorofila a/b (Ralph *et al.* 2007). Por ejemplo, (Lee y Dunton, 1997) observó cambios en ambas concentraciones de pigmento y relaciones Chl a/b en respuesta a la limitación de luz. La irradianza bajo el agua varía en función de la profundidad, la materia orgánica disuelta y las partículas suspendidas, estos factores combinados con cambios fuertes en las estacionalidades, podrían causar que la concentración de clorofila a disminuya, o una disminución del rango de clorofila a/b en respuesta a la reducción de luz (Lee y Dunton, 1997) ya que se ha demostrado que ante la falta de luz la clorofila a puede pasar a clorofila b.

Como se muestra en la Figura 3, el aumento de la frecuencia de fenómenos meteorológicos extremos, la escorrentía del suelo, la resuspensión de sedimentos, cambios en los patrones de precipitación de lluvia, cambios drásticos en salinidad y el aumento de la temperatura de la superficie del mar causan un aumento de la demanda de respiración, que, en combinación con tasas fotosintéticas reducidas de la luz, alteran el balance de carbono en detrimento de la salud de la planta (Ralph *et al.* 2007). Estos efectos directos e indirectos de la luz alteraran el crecimiento y la supervivencia de los pastos marinos.

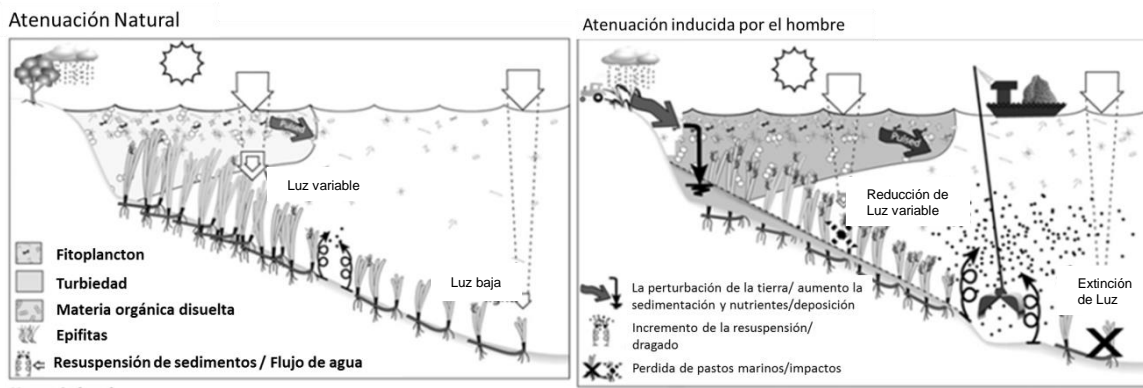


Figura 3. Modelo conceptual de la reducción de la luz y el impacto sobre el pasto donde se puede observar (A) El crecimiento de los pastos marinos es influenciado por la calidad óptica del agua, incluyendo sólidos suspendidos, materia orgánica disuelta y fitoplancton, que varían fuertemente de acuerdo con la escorrentía, así como el crecimiento de microalgas en las hojas. (B) Las actividades humanas, tanto en la tierra como en el agua, han provocado cambios en la calidad del agua, ya que están reduciendo la luz disponible para los Pastos marinos. Modificado de (Ralph *et al.* 2007).

2.4.2 Lipoperoxidación

Es bien sabido que el oxígeno es esencial para los organismos aerobios; sin embargo, existen especies reactivas de oxígeno, reducidas o activadas de esta molécula que son altamente peligrosas debido a su capacidad de oxidar distintos componentes celulares (Skyba *et al.* 2012). Existen distintos factores como los metales, luz ultravioleta, temperaturas extremas y diversos contaminantes que están asociados con la sobreproducción de especies tóxicas de oxígeno y daño celular en los productores primarios (Aránguiz *et al.* 2009). La producción de dichos radicales es equilibrada con mecanismos conocidos como moléculas antioxidantes,

la superóxido dismutasa y catalasa son la primera línea de antioxidantes (Skyba *et al.* 2012). Una pequeña proporción (2-3%) de las especies reactivas de oxígeno puede escapar del rol protector de los mecanismos antioxidantes, causando daño oxidativo a los componentes celulares. El desequilibrio entre la producción y la neutralización de las especies reactivas de oxígeno por los mecanismos antioxidantes se llama estrés oxidativo. Estas formas tóxicas del oxígeno pueden reaccionar con los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, pigmentos y otras biomoléculas, causando su degradación (Aránguiz, 2009).

Este proceso de estrés oxidativo se considera un mecanismo de toxicidad significativo sobre los organismos a los que afecta y su evaluación puede servir como una herramienta de diagnóstico, con la finalidad de predecir el impacto de ciertos contaminantes sobre los organismos (Ochoa y Gozález, 2008).

Uno de los principales efectos causados por el estrés oxidativo es la oxidación de las membranas lipídicas (lipoperoxidación), ésta puede darse en los lípidos que se encuentran en las membranas celulares, alterando su permeabilidad, fluidez, cohesión y función metabólica, hasta llegar a la muerte celular para dar origen a compuestos como el malonaldehído (MDA) (Ochoa y Gozález, 2008), formado por el rompimiento de ácidos grasos, este compuesto (MDA) ha sido identificado como un producto con el que se puede cuantificar la peroxidación lipídica (Buege y Aust, 1978) además, es un parámetro importante para la determinación de estrés oxidativo, el malonaldehído se ha identificado como un producto reactivo al ácido tiobarbitúrico (TBA) (Chérif *et al.* 1996). Una de las técnicas más comúnmente utilizadas en peces para medir los niveles de peroxidación lipídica es el empleo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que cuantifica los niveles de producción de malonaldehído.

2.4.3 Azúcares

Los carbohidratos son moléculas estructurales y de almacenamiento muy importantes para el metabolismo tanto de organismos terrestres como acuáticos (Bianchi y Canuel, 2011). Las plantas asignan recursos para el crecimiento o almacenamiento de productos, lo que generalmente es una acumulación de recursos. Sin embargo, no sabemos en qué condiciones las plantas almacenan o acumulan recursos básicos como los carbohidratos, los cuales son necesarios para el crecimiento. Las plantas también regulan la partición de los recursos no sólo mediante la asignación entre crecimiento y almacenamiento, sino también mediante el ajuste del crecimiento de raíces y brotes (Mooney, 1995).

La capacidad de dichas plantas para soportar eventos de perturbación depende en gran medida de dichas reservas de azúcares, las cuales desempeñan un papel importante en la resiliencia de estas plantas, ya que sirven como un mecanismo de rescate que les permite mantener su respiración y reconstruir sus tejidos frente a una perturbación (Campbell *et al.* 2012). Diversos estudios han demostrado que la capacidad de generar nuevos brotes está directamente relacionada con la cantidad de azúcares almacenados (Puijalon *et al.* 2008). Bajo condiciones naturales aquellas plantas que destinan una alta proporción de azúcares para el almacenamiento se verán favorecidos en caso de daño (Puijalon *et al.*, 2008). Los pastos marinos destinan una parte sustancial al almacenamiento subterráneo es decir en sus rizomas (Campbell *et al.* 2012).

2.4.4 Compuestos fenólicos

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis, éstos se llaman metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales, otros compuestos tienen funciones protectoras frente a depredadores, actuando como

repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales o responden a variaciones ambientales, como los ocasionados por la época del año, la fertilización y enfermedades, lo cual influye en la producción de estos metabolitos secundarios (Strack, 1997).

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, por lo que son de gran importancia, para las respuestas de las plantas, evitando la invasión de microorganismos o patógenos, además de su capacidad antioxidante (Sepúlveda *et al.* 2003)

Los compuestos fenólicos son sintetizados en las hojas y luego son transportados a otros tejidos. Por lo tanto, la cantidad total de estos compuestos en las hojas son mayores frente a una situación de estrés (Perez *et al.* 2014). Las hojas de las plantas presentan variaciones en las concentraciones de compuestos fenólicos en las distintas temporadas anuales, esto se debe al estrés que causan los cambios en la temperatura, radiación UV, pH, oxígeno disuelto, CO₂ disponible, organismos patógenos (como bacterias y hongos), depredadores y la presencia de contaminantes, las cuales además podrían presentarse de manera sinérgica, provocando un estrés distinto al que ocasiona cada factor por separado, y teniendo como consecuencia variaciones en la producción de compuestos fenólicos (Chaves *et al.* 1997).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se comportan los niveles de los biomarcadores de estrés del pasto marino *Thalassia testudinum* en la Reserva de la Biosfera Los Petenes en un ciclo anual?

4. HIPÓTESIS

Si los biomarcadores de estrés en *Thalassia testudinum* de la Reserva de la Biosfera Los Petenes responden al estrés ambiental a lo largo del año entonces, conociendo sus variaciones en un ciclo anual éstos servirán como herramientas de diagnóstico temprano en caso de un derrame de hidrocarburos en la Sonda de Campeche.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer la línea base de respuesta de los biomarcadores de estrés del pasto marino *Thalassia testudinum* en la Reserva de la Biosfera Los Petenes.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las concentraciones de clorofilas a, b y totales en ejemplares de pasto marino (*Thalassia testudinum*).
- Evaluar la lipoperoxidación en tejidos de especímenes colectados de pasto marino (*Thalassia testudinum*).
- Medir la concentración de azúcares en el pasto marino (*Thalassia testudinum*).
- Cuantificar la concentración de fenoles en tejido de pasto marino (*Thalassia testudinum*).
- Buscar la relación entre los biomarcadores, los parámetros fisicoquímicos y la presencia de actividades antropogénicas en la Reserva de la Biosfera Los Petenes.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo se realizó en la RBLP, que se encuentra en el estado de Campeche, dicha reserva se localiza en la zona costera norte del estado y al sureste del Golfo de México, es una larga y estrecha franja costera, que cuenta con porciones terrestres y marinas. Queda comprendida entre los 20°51'30" y 19°49'00" de latitud norte y 90°45'15" y 90°20'00" de longitud oeste (Figura 4). Limita al norte con la Reserva de la Biosfera Ría Celestún y el Golfo de México, al oeste con el Golfo de México. (CONANP, 2006).

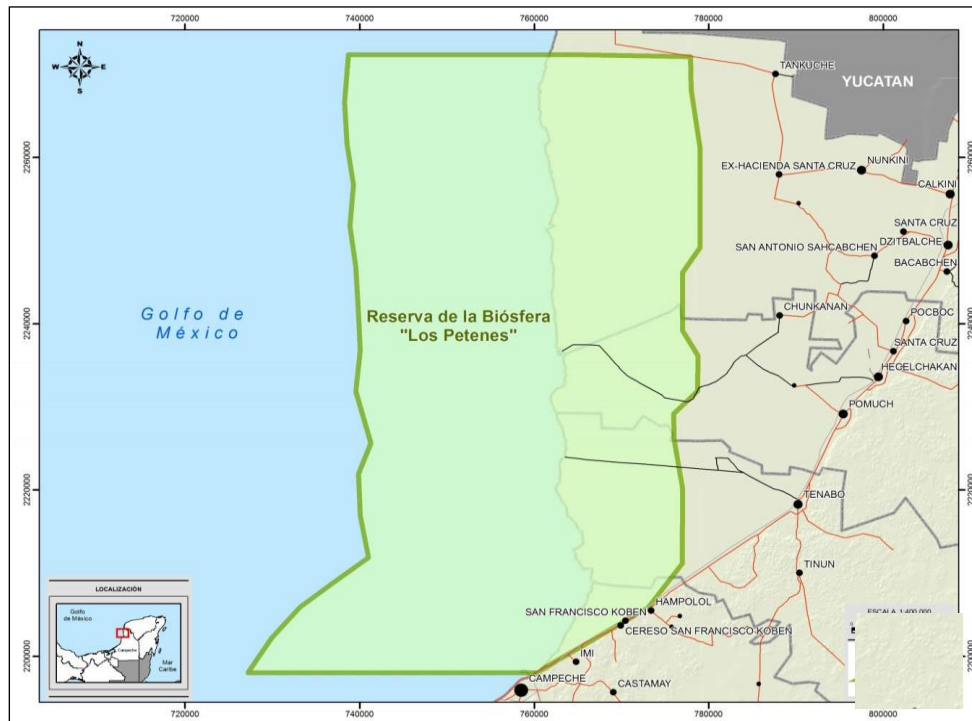


Figura 4. Reserva de la Biosfera Los Petenes ubicada en el estado de Campeche (Tomado de: CONANP 2006).

La importancia biológica de RBLP se tiene principalmente en los sistemas hídricos subterráneos, marinos y costeros donde se desarrollan asociaciones de vegetación, y que además, junto con las pequeñas lagunas costeras funcionan como área de protección ante tormentas y huracanes, aquí se alojan distintas especies protegidas

por la norma NOM-059-2001, como el mangle botoncillo, palo de tinte y un crustáceo llamado cacerolita de mar (especie única en el continente), entre otros. Anualmente se presenta el tránsito y reproducción de aves como flamencos y garzas. En el área de pastos marinos aloja a 61 especies de peces de la cual el de mayor valor comercial es el boquinete (CONANP, 2003)

En la RBLP los principales hábitats son: bajos marinos cubiertos por pastos marinos, manglar chaparro; manglar de cuenca; pastizal inundable; petenes (con ejemplares de manglar, selva mediana subcaducifolia y de selva mediana subperennifolia/perennifolia); selva baja inundable; selva baja caducifolia; y blanquizales. Por la superficie ocupada, sobresalen los pastos marinos (*Thalassia testudinum* y *Ruppia maritima*), localizados en toda la parte marina de la reserva; el manglar de franja, distribuido en todo el litoral de la reserva; el manglar de cuenca, acentuado en la parte sur y centro de la reserva; y los petenes (con sus manantiales u ojos de agua), distribuidos en toda la reserva, su estado de salud de los hábitats es bueno a excepción de los petenes (Barrios *et al.* 1992).

La vegetación sumergida de pastos marinos en la plataforma continental de la Reserva está compuesta de *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, *Ruppia maritima* y *Siringodium filiforme*. Su significativa extensión tiene el reconocimiento de la mayor superficie de pastos marinos del Golfo de México y Caribe Mexicano. Los niveles de producción de biomasa de *Thalassia testudinum*, se reportan entre los más altos para el golfo de México (1.8-2.7 gC/m² por día) (CONANP, 2003).

En esta zona hay tres periodos climáticos: un periodo de secas de febrero a mayo, un periodo de lluvias de junio a octubre y el de nortes, de octubre a febrero (Wiseman, 1999).

Los tres periodos son representativos de la zona, aunque estos se superponen con frecuencia y varían su intensidad de un año a otro. Los factores ambientales varían temporalmente pero también espacialmente debido a su gran área de aguas poco profundas que favorece un gradiente natural de variables ambientales desde la costa hasta el mar. A lo largo de la costa, el lecho de pastos marinos recibe una

entrada continua de agua subterránea a través de muelles submarinos cerca de la costa, lo que aumenta la heterogeneidad de las variables ambientales (Perry *et al.* 2009, Bauer-Gottwein *et al.* 2011).



Figura 5. Ubicación Geográfica de la Reserva de la Biosfera Los Petenes y sitios de muestreo ubicada geográficamente entre los 20°51'30" y 19°49'00" de latitud norte y 90°45'15" y 90°20'00" de longitud oeste (mapa realizado en Google Earth).

Los patrones de circulación se establecen con base en una rama de corriente de Lazo, la cual forma un giro ciclónico dentro de la sonda de Campeche. Las corrientes a una distancia no mayor entre 180 km mar adentro están influenciadas por los vientos dominantes: en invierno (octubre a febrero) se dirigen al noroeste y en verano (marzo-agosto) se desvía hacia el este ya que se ve influenciado por el flujo del agua proveniente de la corriente de Lazo que al mezclarse con el giro ciclónico lo desvía hacia el este (Ocampo, 2005) como se presenta en la Figura 6.

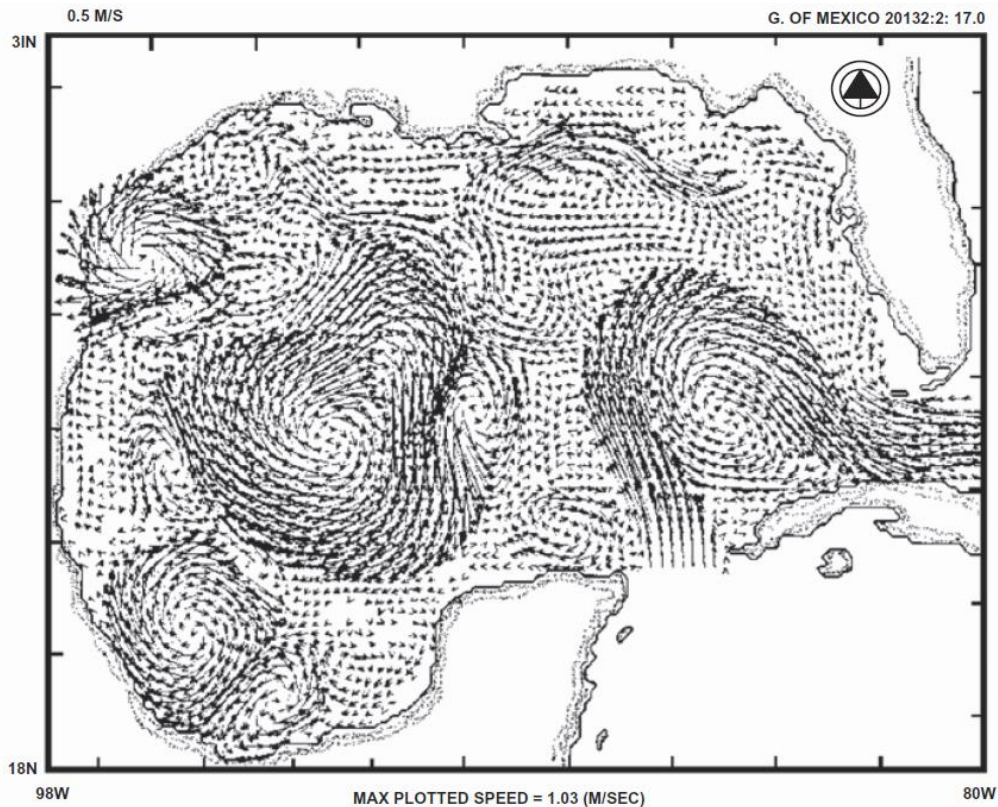


Figura 6. Corrientes marinas del Golfo de México tomado de (Ocampo, 2005)

La zona de Campeche se caracteriza por tener poca profundidad presentando zonas de bajos orientados perpendicularmente. La profundidad que va de cerca de 4 metros a menos 1 metro tiende a disminuir hacia el lado de Los Petenes y aumentar hacia el lado del Lerma. En esta zona se encuentra la desembocadura de la Ría de San Francisco por lo que el aporte de sedimento terrígeno crean una zona de acumulación y al haber una dinámica costera baja favorece a la acumulación de sedimentos (Rivera *et al.* 2012).

Esta profundidad se ve modificada en la temporada de lluvias y nortes ya que el aporte de sedimentos terrígenos aumenta debido al lavado natural del suelo y a la alteración de los suelos, y la ruptura de la coraza calcárea ocasiona la exposición de las calizas blandas superficiales y arenales calcáreas costeros.

7. METODOLOGÍA

La metodología se dividió en dos partes como se puede observar en la Figura 7. La primera parte se llevó a cabo en campo en la cual se realizó la recolección de muestras y la otra es la que se realizó en el laboratorio, donde se aplicaron los procedimientos analíticos para obtener los biomarcadores.

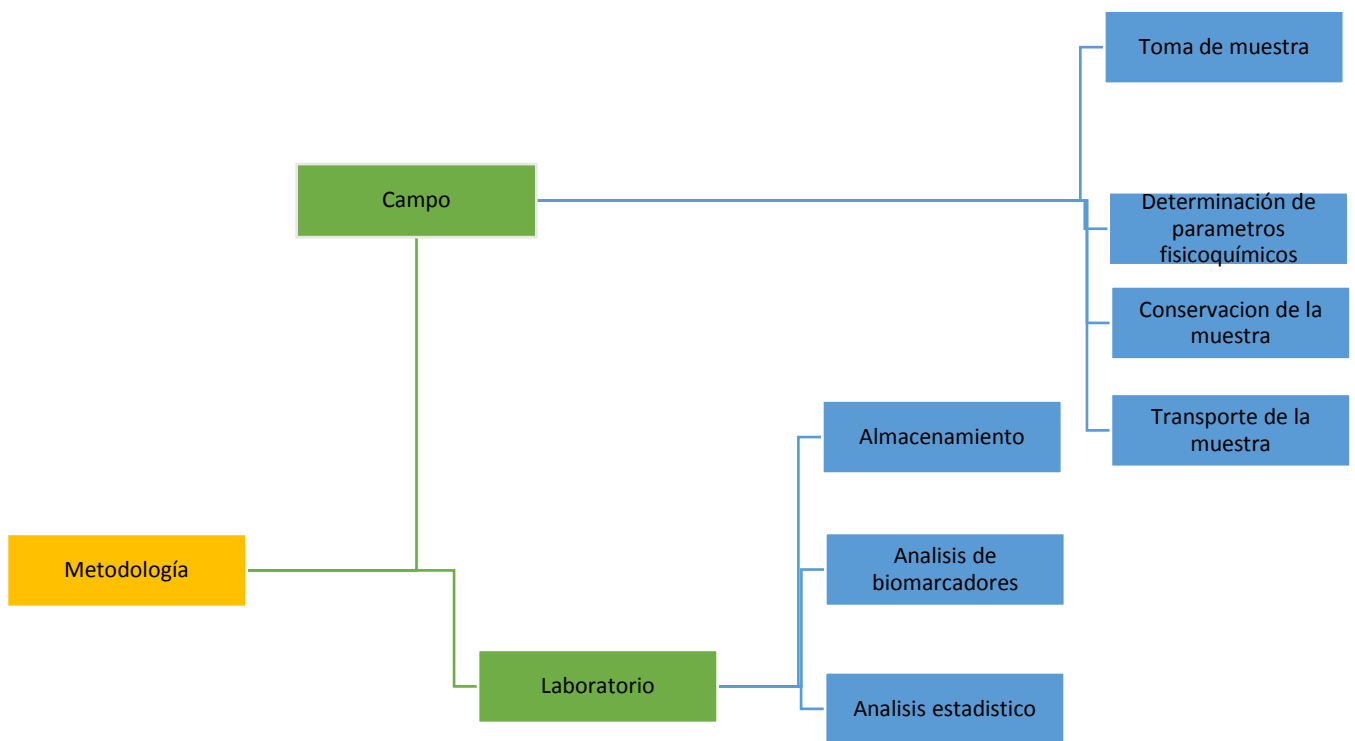


Figura 7. Diagrama de metodología

7.1 METODOLOGÍA DE CAMPO

Se utilizaron los sitios de muestreo del proyecto “Fortalecimiento de la línea base del Golfo de México: indicadores del estado de salud de las comunidades de pastos marinos de la reserva de la biosfera Los Petenes, Campeche”, los cuales fueron establecidos en tres líneas paralelas a partir de la costa dentro de la RBLP en 18 sitios de muestreo. Cada una de las estaciones fue identificada como A, B, C, D, E y F, los transectos tomados mar adentro se identificaron como 1, 2 y 3, quedando el área de muestreo como se muestra en la Figura 8 (Ramírez *et al.* 2010).

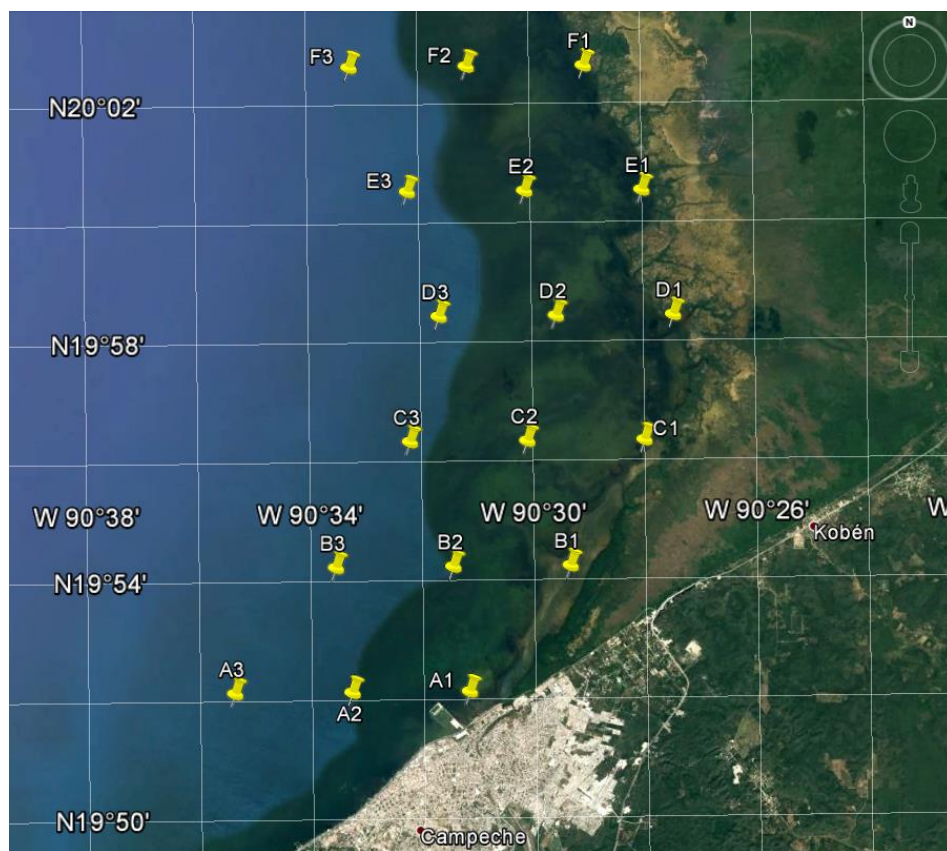


Figura 8. Área y sitios de muestreo ubicados dentro de la Reserva de la Biosfera Los Petenes, México (mapa realizado en Google Earth).

Se efectuaron tres salidas cuatrimestrales para la toma de las muestras, con la intención de cubrir las tres temporadas climáticas: lluvias, secas y nortes.

En cada sitio de muestreo se determinaron los siguientes parámetros físicoquímicos: temperatura, potencial de hidrogeno, salinidad, potencial redox, oxígeno disuelto y solidos suspendidos utilizando un equipo multiparamétrico Marca YSI, Modelo MPS 556 (Figura 9).

La toma de muestras se hizo en los 18 sitios seccionados, en un área de 0.3 m por sitio y se tomaron con un nucleador de 21 cm de diámetro (Figura 9), posteriormente las muestras se lavaron con agua destilada y se preservaron en bolsas de aluminio a 4°C para inhibir su metabolismo, y se transportaron en frío en hieleras, para su posterior análisis en el laboratorio (Ramírez et al. 2010).



Figura 9. Equipo utilizado en campo, para la toma de parámetros físicoquímicos del agua se usó Multiparamétrico YSI y para la toma de muestras de sedimento se recolecto con el nucleador.

7.2 METODOLOGÍA DE LABORATORIO

Antes de comenzar con la parte analítica las muestras recolectadas se lavaron con agua destilada y se cortaron en trozos de aproximadamente 2 cm² con la finalidad de que la muestra recolectada tuviera una mayor homogeneidad, posteriormente se realizó cada una de las determinaciones propuestas.

7.2.1 Cuantificación de clorofilas

Se utilizó la técnica descrita por Arnon (1949) con algunas modificaciones. En la cual, se pesó 1 g de peso fresco de hojas de *T. testudinum*, previamente enjuagadas con agua destilada, las cuales se homogenizaron con 15 ml de acetona al 80%, en un homogeneizador para tejido marca Benchmark modelo D1000 (Figura 10), se centrifugó (centrifuga J-600) dos veces a 5000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Posteriormente, en un espectrofotómetro modelo 21D Spectronic (Figura 11) se realizaron mediciones de las absorbancias a 645 y 663 nm.



Figura 10. Equipo utilizado para la homogenización de las hojas del pasto marino, homogeneizador Benchmark D1000



Figura 11. Muestras de extracción de clorofilas totales y espectrofotómetro Spectronic 21D

7.2.2 Determinación de proteínas.

Se homogenizó 1g de tejido en 10ml de solución Tritón X-100 al 1 % (p/v) , con una Micropipeta de repetición (Figura 13), se utilizó un filtropur S 0.45 para extraer el sobrenadante y se conservaron para su análisis a -4°C posteriormente, se utilizó el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas, adaptado a microplaca (Figura 12) (Herbert *et. al.* 1995).

Se empleó el reactivo Bio-Rad como solución de reacción en una proporción 1:4 con agua destilada y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, las lecturas

se realizaron a 630 nm. Se emplearon 10 μ l de cada muestra por cuadruplicado, 200 μ l de colorante de Bio-rad y se leyeron en lector de Elisa (Figura 14) a una longitud de onda de 630 nm.

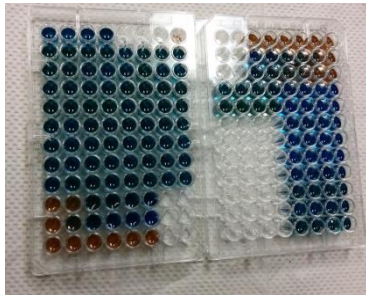


Figura 12. Extracciones de proteínas totales en microplaca



Figura 13. Material utilizado en laboratorio para la obtención de proteínas totales, Micropipeta de repetición



Figura 14. Equipo utilizado para medir proteínas totales, Lector de Elisa

7.2.3 Determinación de lipoperoxidación.

Se utilizó la técnica de Buege y Aust (1978) con modificaciones. Se tomaron 300 μ l del homogenizado (tejido y agua desionizada) y se agregaron 700 μ l de regulador Tris-HCl, 150 μ M pH 7.4 para completar 1 ml. Las muestras se metieron a incubación a 37°C por 30 minutos. Se agregaron 2 ml de ácido tiobarbitúrico (Figura 15) al 0.375% p/v disuelto en ácido tricloroacético al 15%. Posteriormente, se calentaron hasta alcanzar la ebullición por 45 minutos para luego centrifugarlas a 3000 rpm por 10 minutos. Una vez obtenidas las extracciones (Figura 16) se leyó el sobrenadante a 532 nm.

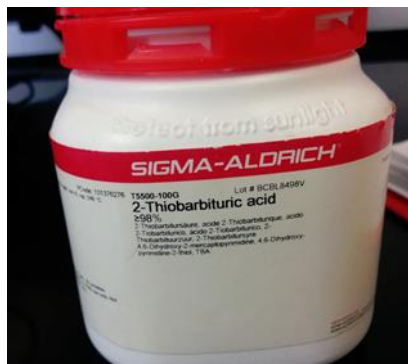


Figura 15. Reactivo utilizado para la determinación de lipoperoxidación, ácido tiobarbitúrico.

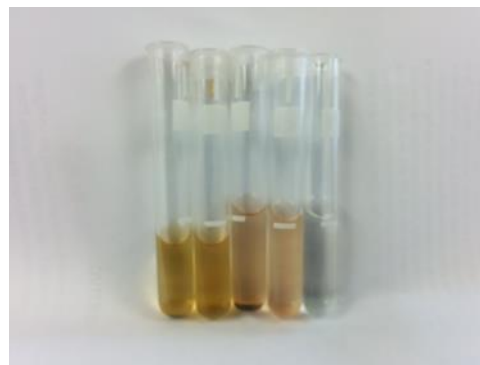


Figura 16. Extracciones hechas para medir lipoperoxidación.

7.2.4 Cuantificación de azúcares totales

Se siguió la técnica de Dubois *et al.* (1956) para la cuantificación de los azúcares totales, la cual consistió en: enjuagar las muestras con agua destilada, se pesó 1 g de muestra de peso fresco de *T. testudinum*, se homogenizó con 10 ml de etanol al 80% y se centrifugó dos veces a 3000 rpm durante 10 minutos (Figura 17). Posteriormente, en un tubo Corning de 15 ml se agregó 1 ml del sobrenadante al cual se le adicionó 1 ml de solución de fenol al 5% y 5 ml de ácido sulfúrico, se homogenizó en hielo y se aforó a 15 ml con agua destilada (Figura 18). Su lectura fue tomada a una longitud de onda 490 nm y para la curva de calibración se usó glucosa.



Figura 17. Centrifuga J-600
Equipo utilizado para
centrifugar los extractos de
pastos marinos



Figura 18. Extracción de azúcares
totales

7.2.5 Determinación de fenoles

Se utilizó la técnica de Swain y Hills (1959) con modificaciones, la cual consistió en los siguientes pasos: se pesaron 1 g de muestra de pasto marino (*T. testudinum*) previamente enjuagada con agua destilada, en 10 ml de etanol al 80% se homogenizó la muestra y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. En un tubo Corning se extrajo 1 ml de la muestra a la cual se le agregaron 3 ml de solución fenilfenol al 10% y 1 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio, aforando a 12 ml; éste se agita y se colocó a baño María a 50 °C durante 30 minutos. Una vez

que se obtuvieron los extractos (Figura 19) Se analizó a una longitud de onda 630 nm.

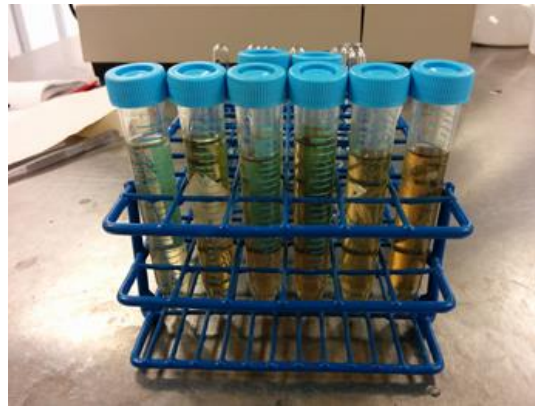


Figura 19. Se muestran los fenoles extraídos de las muestras de pasto marino

7.2.6 Construcción de mapas de isolíneas.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los distintos biomarcadores en pasto marino (*Thalassia testudinum*) fueron desplegados sobre mapas mediante el programa Ocean Data View (ODV) (Schlitzer, R., Ocean Data View, <http://odv.awi.de>, 2015). Los resultados están representados con colores, donde los colores conocidos como calientes (amarillo a rojo) representan los valores más altos y los colores conocidos como fríos, azul y morado, representan valores bajos (Figura 20).

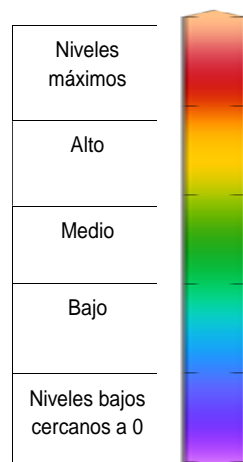


Figura 20. Colores para las isolíneas obtenidos del programa Ocean Data View.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.1 Estadística paramétrica

Se realizó una estadística paramétrica para conocer la distribución de los resultados, los valores promedios y su desviación estándar. Los valores promedios fueron desplegados en mapas de isolíneas para ver su comportamiento espacial.

Se analizó la normalidad de los datos y se comparó entre épocas utilizando pruebas con ANOVAS para cada variable que se midió para comprobar si existía variabilidad temporal en algunas de las variables o los factores medidos.

Se realizaron ANOVAS por transectos y entre todos los sitios para probar la variación espacial del comportamiento de las variables

Se llevó a cabo un análisis estadístico multivariado en el que se buscó el coeficiente de correlación entre los biomarcadores y los parámetros fisicoquímicos.

Con aquellas muestras que presentaron correlación se aplicaron pruebas estadísticas multivariadas con la finalidad de identificar si existe, además, una igualdad de varianzas y la prueba para identificar igualdad de medias.

Posteriormente, se realizó un análisis multivariado de factores ambientales y de biomarcadores indicadores de estrés en pastos marinos considerando las tres estaciones de temporalidad: secas, lluvias y nortes.

Datos analizados:

Para el análisis estadístico fueron incorporados cinco parámetros fisicoquímicos para cada uno de los 18 sitios de colecta en cada una de las tres temporadas de estudio en la RBLP, los cuales fueron retomadas de la base de datos del proyecto “Fortalecimiento de la línea base del Golfo de México: indicadores del estado de salud de las comunidades de pastos marinos en la Reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche “

Etiquetas de los parámetros ambientales:

- Temp(°C)
- Sal(ups)
- O2_(mg l⁻¹)
- pH
- OPR_(mV)

Biomarcadores de estrés: se analizaron ocho biomarcadores en cada uno de los 18 sitios de colecta dentro de la RBLP para cada una de las tres temporadas (secas, lluvia y nortes):

Etiquetas de los biomarcadores

- clorofila_a
- clorofila_b
- clorofila_total
- Relación_a/b
- Azúcares
- Fenoles
- Proteínas
- Lipo

8.2 Estadística No paramétrica

8.2.1 Biomarcadores

Inicialmente se hizo una matriz de correlación y se encontró que la clorofila total tuvo una correlación de 0.97 con la clorofila a y 0.95 con la clorofila b. Debido a su alta correlación esta variable se excluyó del análisis multivariado ya que su comportamiento sería igual al de las variables altamente correlacionadas.

Los datos de los biomarcadores se normalizaron, lo cual consistió en que a cada valor del parámetro se le restó el valor promedio y se dividió entre la desviación estándar. Una vez normalizados los datos se realizó una matriz de disimilitud para

trabajar con las disimilitudes de los biomarcadores por sitio en vez de los valores crudos o los normalizados de acuerdo a Warwick y Clarke (1995).

Asimismo, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) que permitió reducir la variación de los datos en dos componentes principales.

El mismo procedimiento aplicado a los datos de biomarcadores se utilizó para los parámetros ambientales.

Al final, se realizaron matrices de disimilitud de biomarcadores y de parámetros ambientales y ambas matrices se sometieron a un análisis de correlación de matrices para saber si éstas se relacionan, en otras palabras, saber si el ambiente influye en los biomarcadores.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS, (Interpretación vía estadística paramétrica).

9.1.2 Promedios generales para toda la zona de estudio en cada temporada

En la tabla 1 se presentan los valores promedio y su respectiva desviación estándar para cada uno de los factores ambientales medidos en cada una de las temporadas. La temperatura promedio más alta, fue en la época de secas con 30.03 ± 0.9 °C, sin embargo, esta temperatura sigue siendo adecuada para la subsistencia de los pastos marinos (López, 1997).

La salinidad y el oxígeno disuelto presentaron los niveles más bajos en la temporada de nortes con 32.5 ± 3.8 ups y 4.3 ± 1.04 mg/l respectivamente, lo cual podría ser un factor estresante para los pastos marinos ya que, en el caso de la salinidad, se presentan cambios rápidos en este parámetro y, frente a cambios hipo-salinos, la tolerancia de las praderas es menor (Kahn y Durako, 2006), de forma general, se obtuvieron valores de oxígeno disuelto cercanos o superiores a 4 mg/l, como marcan los lineamientos de calidad del agua (CONAGUA, 2016), lo cual nos indica que solo en nortes (4.3 ± 1.4 mg/l) se registraron concentraciones menores en este parámetro, por lo que, en algunos sitios se podría presentar estrés debido a sus bajos niveles. La importancia de este resultado se debe a que de existir baja concentración de oxígeno en la columna de agua esto es un indicador de menor fotosíntesis (producción de oxígeno) en el pasto y mayor respiración (consumo de oxígeno), lo que puede ocasionar un desbalance de carbono y afectar el crecimiento y subsistencia del pasto marino.

El pH está directamente asociado con el consumo de carbono. Cuando incrementa la fotosíntesis las plantas consumen mayor cantidad de CO_2 y la especie química que prevalece es el carbonato, esto provoca un aumento del pH, En contraste, cuando hay poco consumo de CO_2 predomina la especie química HCO_3 que hace que el pH sea menor. El pH en el área de muestreo tuvo para la época de lluvias el

nivel más bajo (7.9 ± 0.1 en promedio) sin embargo este pH es adecuado para la subsistencia del pasto marino; (Moore *et al.* 1997). El potencial redox presentó un promedio menor en época de lluvias con -89.7 ± 15.5 mV; sin embargo, esto no es un factor que pudiese propiciar estrés en las praderas de pastos marinos, ya que éstas crecen en sedimentos con potenciales redox entre -175 y $+ 300$ mV (Enriquez *et al.* 2001).

Tabla 1. Promedios de los parámetros fisicoquímicos en secas, lluvias y nortes.

Temporada	Temperatura (°C)	Salinidad (ups)	O. D. (mg/l)	pH	Potencial redox (mV)
Secas	30.03 ± 0.9	42.98 ± 0.9	6.38 ± 1.3	8.35 ± 0.04	-103.8 ± 11.1
Lluvias	28.3 ± 0.8	44.3 ± 1.4	6.3 ± 0.9	7.9 ± 0.1	-89.7 ± 15.5
Nortes	27.9 ± 1.1	32.5 ± 3.8	4.3 ± 1.04	8.4 ± 0.19	-100.01 ± 6.3

9.2 Comparaciones por temporada

9.2.1 Temperatura

Las mediciones de temperatura (°C) presentaron promedios de 30.03 ± 0.05 (secas), 28.29 ± 0.08 (lluvias) y 27.96 ± 0.19 (nortes). En la época más fría (nortes), el sitio con menor temperatura fue el D1 (23.27 °C), y la temperatura más alta se encontró en el sitio F2 en la temporada de lluvias (45.98 °C). Al comparar la temperatura promedio de cada una de las épocas climáticas se encontró que la

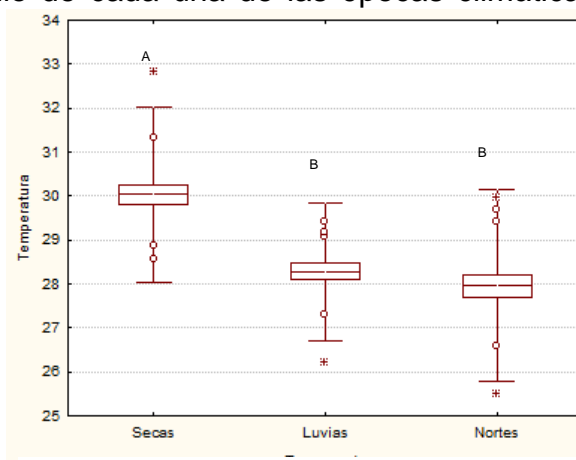


Figura 21. Resultados de temperatura (°C)

temperatura de la época de secas fue mayor a la de lluvias y nortes (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F= 23.9$) (Figura 21).

En cuanto a la distribución espacial de este parámetro (Figura 22) se observó una variación importante en el sitio B1, ya que en secas registró el nivel más alto en dos de los tres muestreos (32.84 °C) y la temperatura más baja se registró en nortes (25.5°C) como se muestra en la Figura 22. Estas variaciones pueden relacionarse con las aportaciones de agua residual ubicadas en la cercanía de éste sitio. En estudios previos se reporta que las temperaturas que favorecen al pasto marino en cuanto a su producción de semillas y generación de nuevos brotes están en un rango de 25°C y 30°C, y que temperaturas arriba de 33°C pueden provocar que las praderas de pasto marino disminuyan su producción (López, 1997). Por lo tanto, durante las distintas épocas de muestreo los valores registrados en este estudio estuvieron dentro del rango de temperaturas favorables, por lo que las condiciones de temperatura que presenta el sitio son buenas para su reproducción.

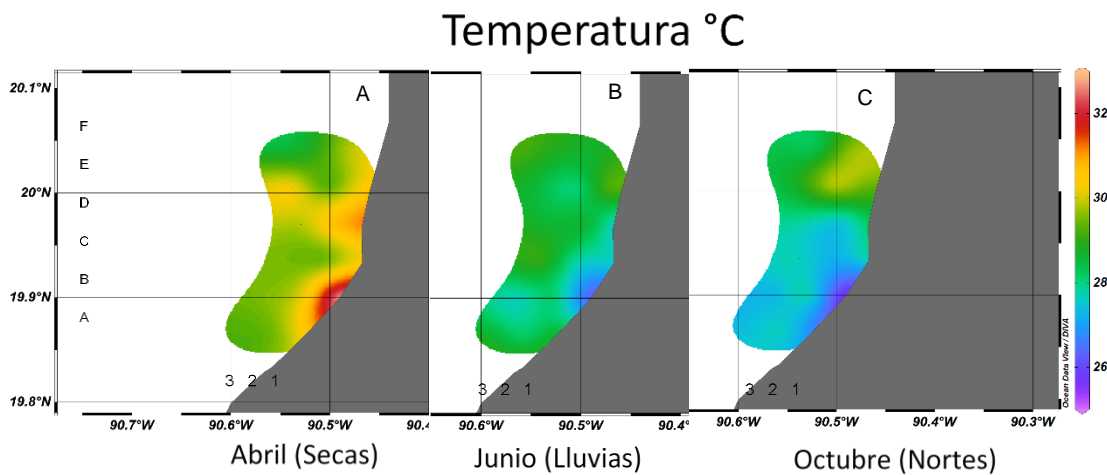


Figura 22. Resultados de isólineas Temperatura °C

9.2.2 Salinidad

La salinidad en la temporada de nortes (32.5 ± 3.8 ups) fue significativamente menor a la de lluvias y secas, según la prueba estadística Kruskal-Wallis ($H=38.2$, $p < 0.05$) (Figura 23).

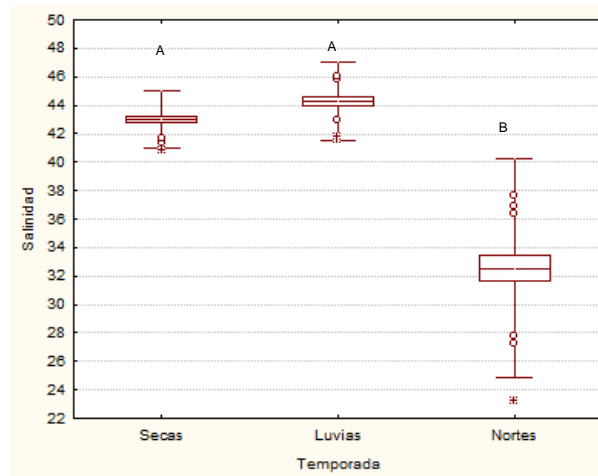


Figura 23. Salinidad (ups)

La salinidad donde se desarrollan de mejor forma los pastos marinos varía entre 20-40 ups; sin embargo, estudios de laboratorio han registrado que existe una disminución en el crecimiento y la biomasa del pasto marino *T. testudinum* frente a cambios rápidos hipo o hiper salinos, aunque también se menciona que frente a un cambio hipo-salino la tolerancia de las praderas es menor (Kahn y Durako, 2006). El sistema presenta un ambiente hípersalino con cambios rápidos de salinidad en las distintas estacionalidades principalmente en las estaciones cercanas a la costa (Figura 24), lo cual podría representar un factor de estrés para las praderas de *Thalassia testudinum*.

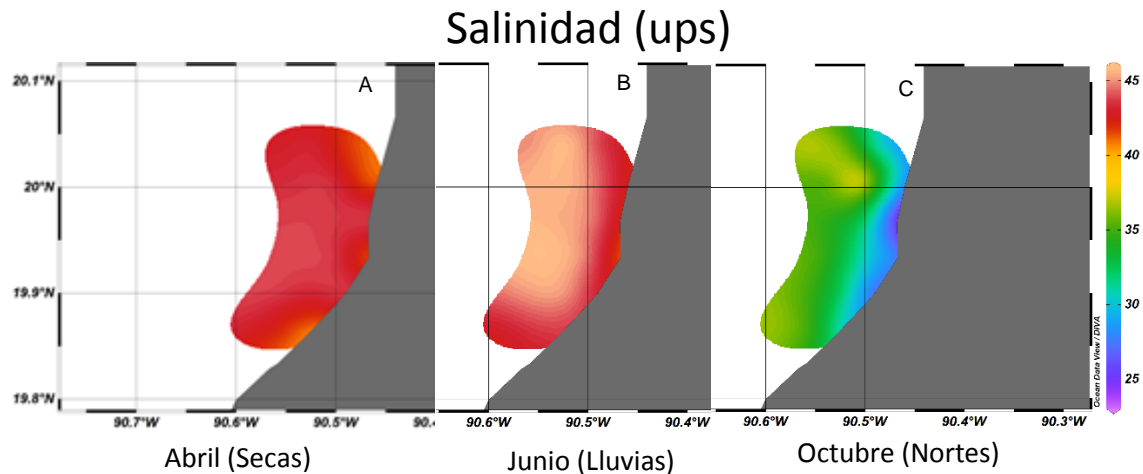


Figura 24. Isólineas con resultados de Salinidad (ups)

9.2.3 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es importante para la vida marina ya que a niveles bajos pueden conducir a una condición subóxica o, en casos extremos a anoxia en el ambiente y, por lo tanto, baja supervivencia de especies; En cambio, cuando el oxígeno disuelto se encuentra por encima de 4 mg/l es un buen indicio de fotosíntesis en el ambiente y descomposición de materia orgánica (Borum *et al.* 2007). Además, el oxígeno disuelto es importante en los procesos de: fotosíntesis, oxidación-reducción, solubilidad de minerales y la descomposición de materia orgánica. Los pastos marinos presentan una producción de oxígeno cíclica que depende de la fotosíntesis y de las condiciones de luz, de esta forma, no habrá una descompensación del oxígeno. Los pastos marinos requieren del oxígeno para mantener su metabolismo tanto en sus hojas como en los rizomas, por lo cual en condiciones de deficiencia de oxígeno son vulnerables a la exposición de metabolitos secundarios debido a su alta actividad metabólica. Además de la importancia del oxígeno dentro de los tejidos de los pastos marinos, el mantenimiento de las condiciones óxicas alrededor de las raíces puede proporcionar una protección eficaz contra la invasión de compuestos tóxicos. La anoxia del tejido altera el crecimiento de las raíces, la absorción de nutrientes y la translocación de nutrientes y carbohidratos (Smith *et al.* 1988). Esto permite la invasión de fitotoxinas y sulfuros (Borum *et al.* 2007).

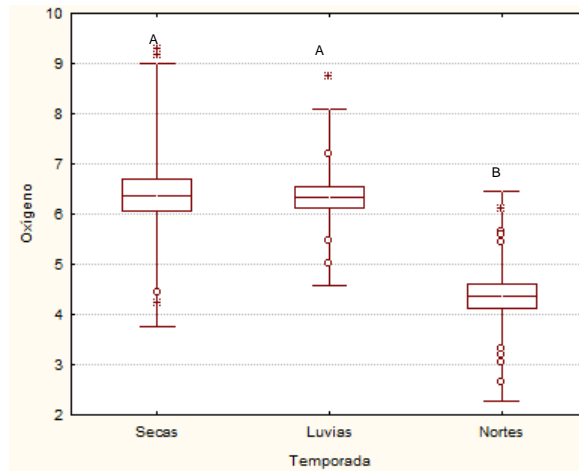


Figura 25. Oxígeno disuelto (mg/l)

El Oxígeno disuelto presentó valores desde 2.65 mg/l, registrado en el sitio F2 en la temporada de nortes, hasta 9.28 mg/l en secas en D1; este parámetro presentó diferencias significativas en la temporada de nortes (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F=19.8$) (Figura 25), mostrando la mayor variabilidad en secas. De forma general se obtuvieron valores de oxígeno disuelto cercanos o superiores a 4 mg/l, con excepción de algunas estaciones en nortes (Figura 26), en la estación F2 donde se presenta el valor más bajo representa un factor estresante para el desarrollo de los pastos marinos y otros organismos acuáticos, ya que podría significar que hay disminución en la fotosíntesis ya que, en la temporada de nortes, disminuyen las horas luz, incrementan los vientos y el movimiento que se tiene sobre la superficie, ocasiona mayor turbidez en el agua y afecta la penetración de luz, teniendo como consecuencia, la disminución en fotosíntesis y en la producción de oxígeno.

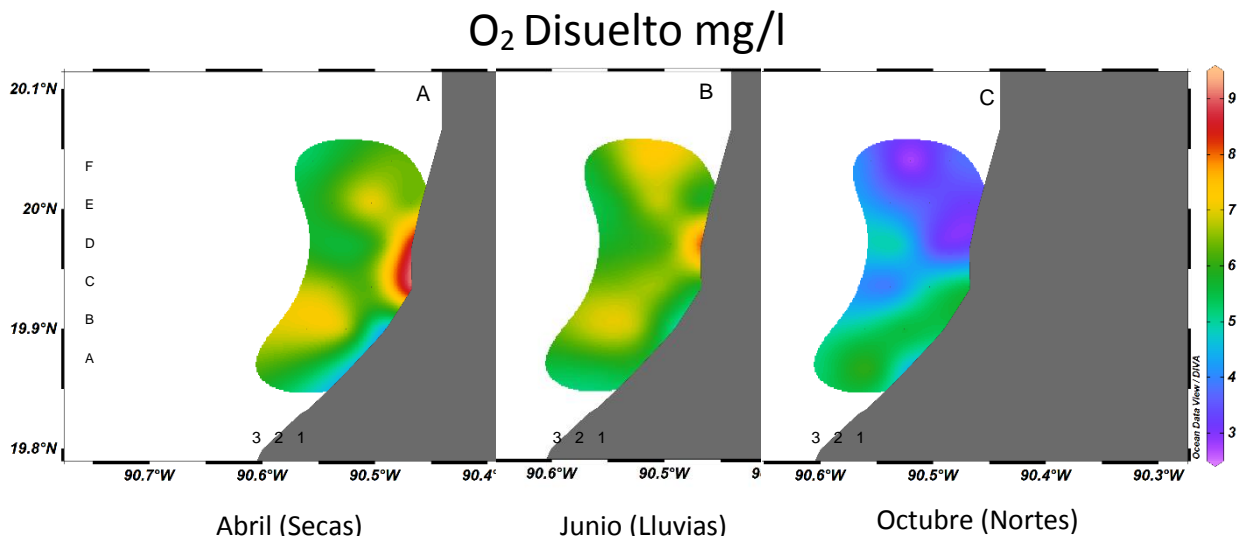


Figura 26. Isolíneas de Oxígeno disuelto mg/l

9.2.4 Potencial de hidrogeno

El pH mostró diferencias significativas en la temporada de lluvias (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F=62.6$), siendo ésta la que presenta niveles menores (Figura 27).

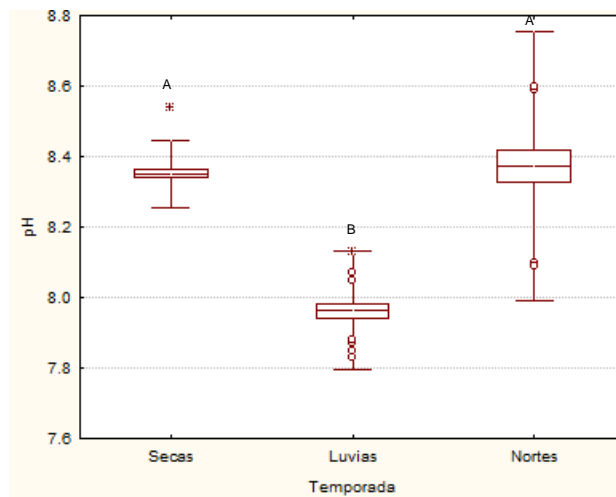


Figura 27. Potencial de Hidrogeno

Los resultados del potencial de hidrogeno (pH) muestran un sistema alcalino con lecturas superiores a 7.8, siendo este valor el mínimo registrado en el sitio E2 en la temporada de lluvias y un máximo de 8.6 registrado en el sitio B2 en el temporal de nortes (Figura 28). Korhonen *et al.* (2012) reportó que a pH 8 los pastos marinos presentan un mejor rendimiento cuántico, es decir; una mejor fotosíntesis, y mayor tasa de recuperación y que la variación del pH puede alterar las funciones fisiológicas de los pastos marinos, debido a que los cambios repentinos en el sedimento o el agua pueden afectar negativamente la fotosíntesis de los pastos marinos.

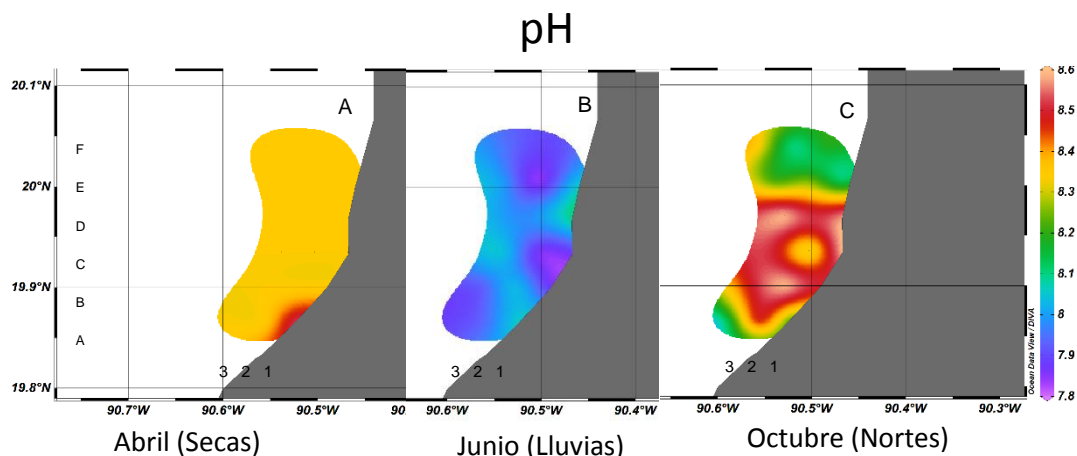


Figura 28. Resultados en Isolíneas Potencial de Hidrogeno

9.2.5 Potencial Redox

Este parámetro presentó diferencias significativas en la temporada de lluvias (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F=7.1$) (Figura 29). Los pastos marinos crecen en sedimentos con Potencial Redox entre -175 y + 300 mV (Terrados *et al.* 1999; Enríquez *et al.* 2001; Marbá-Duarte, 2001). Los resultados registrados en el área de estudio en las tres temporadas fueron las siguientes -103.8 ± 11.1 , -89.7 ± 15.5 , -100.01 ± 6.3 para secas, lluvias y nortes respectivamente (Figura 30), lo que indica que los valores registrados para este parámetro son adecuados para el crecimiento

y la supervivencia de estos, además, la estructura de los rizomas del pasto marino restringe la magnitud de los efectos de las condiciones redox del sedimento. La actividad de los pastos marinos, es capaz de atenuar las condiciones anóxicas del sedimento dentro de las capas ocupadas por la rizosfera., el efecto que los pastos marinos tiene sobre las propiedades redox del sedimento se cree que es el resultado de la liberación de oxígeno a través de la raíz, y la oxidación de compuestos reducidos (por ejemplo, hierro, sulfuro) creando una zona subóxica (Marbá y Duarte, 2001).

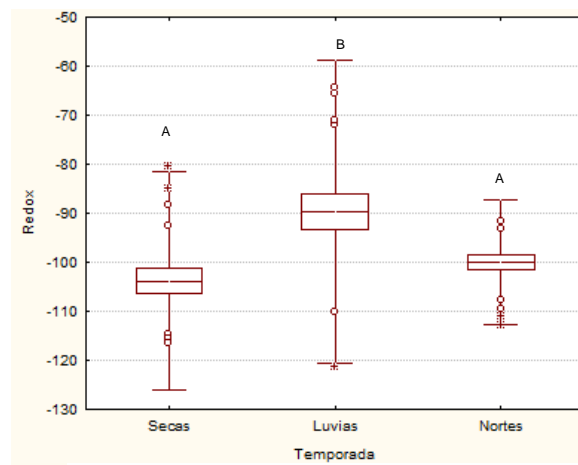


Figura 29. Potencial Redox (mV)

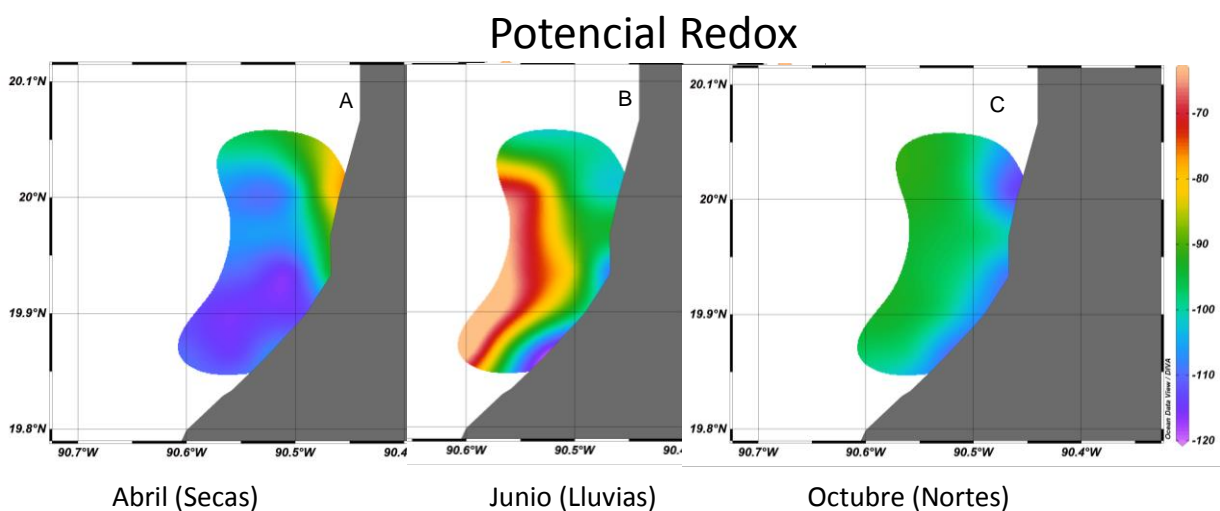


Figura 30. Resultados en Isolíneas Potencial Redox (mV)

9.3 Biomarcadores (Interpretación vía estadística paramétrica).

9.3.1 Promedios generales para toda la zona de estudio en cada temporada

En la tabla 2, se presentan los valores promedio y su respectiva desviación estándar para cada uno de los biomarcadores medidos en las muestras de *T. testudinum* para cada una de las temporadas. La concentración de clorofila más alta fue en la época de secas (0.30 ± 0.07 mg/g) y, el menor, fue en la época de lluvias (0.18 ± 0.06 mg/g) lo cual podría ser un factor de estrés, ya que éstas están relacionadas directamente con la fotosíntesis, la producción de oxígeno y la asimilación del carbono en la planta por lo que, al disminuir estos factores podría repercutir en la disminución de las praderas, los patrones se repiten en la concentración de clorofila b y clorofilas totales, en cuanto a la relación a:b el menor se presentó en lluvias (1.31 ± 0.10 mg/mol), lo cual podría significar que en esta temporada la planta presenta una menor plasticidad fisiológica.

Con respecto a los resultados de azúcares, se presentó el mayor promedio en el periodo de lluvias (0.27 ± 0.07 mg/g), lo cual podría significar un estado de estrés ya que, los pastos marinos transportan sus reservas de carbohidratos de la raíz a las hojas como un mecanismo de rescate ante un impacto.

La producción de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, está relacionada con situaciones de estrés, por lo que la temporada de lluvias donde se presentó el promedio más alto (0.27 ± 0.07 mg/g) podría representar un factor estresante para las praderas.

Por otro lado, en la temporada de lluvias se presentó el menor nivel de producción de proteínas (9.21 ± 2.39 mg/ml), lo cual está inversamente relacionado con la lipoperoxidación que presenta su mayor promedio en lluvias (0.75 ± 0.14 nmol/mg) se infiere que podría ser debido a los altos niveles de lipoperoxidación que, a su vez, representa la presencia de especies reactivas de oxígeno, las cuales suprimen la síntesis de casi todas las proteínas teniendo como consecuencia la inhibición de la reparación del daño fotosintético (Murata *et al.* 2006).

Los resultados de los biomarcadores en general muestran información biológica importante sobre el estado en el que se encuentra el área de estudio, esta información puede ser de gran utilidad para generar una alerta temprana de señales de estrés, dichas señales se observaron principalmente en la temporada de lluvias y nortes, además los patrones de comportamiento estacional en cuanto a situaciones estresantes nos muestran evidencias dinámicas por medio de los biomarcadores y a través de estos se pueden evaluar los efectos de estresores sobre el pasto marino y a su vez los resultados que se muestran en la tabla 2 podrán ser considerados para evaluar las situaciones estresantes sobre el pasto marino *Thalassia testudinum*.

Tabla 2. Resultados de biomarcadores en *Thalassia testudinum* en tres épocas del año.

	Abril (Secas) Primer muestreo			Junio (Lluvias) Segundo muestreo			Octubre (Nortes) Tercer muestreo		
	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio
Clorofila a (mg/g)	0.18	0.46	0.30 ± 0.07	0.08	0.36	0.18± 0.06	0.14	0.45	0.29± 0.08
Clorofila b (mg/g)	0.11	0.33	0.21± 0.06	0.06	0.27	0.13± 0.04	0.14	0.35	0.25± 0.06
Clorofilas totales (mg/g)	0.29	0.81	0.51± 0.13	0.14	0.63	0.31± 0.11	0.30	0.80	0.54± 0.13
Relación a/b (mg/mol)	1.21	2.06	1.47± 0.20	1.21	2.06	1.47± 0.48	0.98	1.27	1.31± 0.10
Azúcares (mg/g)	0.10	0.69	0.26± 0.17	0.16	0.39	0.27± 0.07	0.05	0.18	0.11± 0.04
Fenoles (mg/g)	0.09	0.75	0.23± 0.15	0.16	0.39	0.25± 0.07	0.06	0.29	0.14± 0.07
Proteínas (mg/ml)	13.37	30.47	23.74± 4.35	6.49	15.00	9.21± 2.39	24.04	32.63	28.16± 2.05
Lipoperoxidación nmol/mg proteína	0.40	0.89	0.53± 0.12	0.44	0.95	0.75± 0.14	0.28	0.60	0.36± 0.07

9.3.2 Comparaciones de biomarcadores por temporada

Clorofila a

En la Figura 31 se muestra la variación estacional de las concentraciones de clorofila a; se puede observar que, en la temporada de lluvias, los niveles muestran diferencias estadísticamente significativas con las épocas de secas y nortes (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F=14.4$)

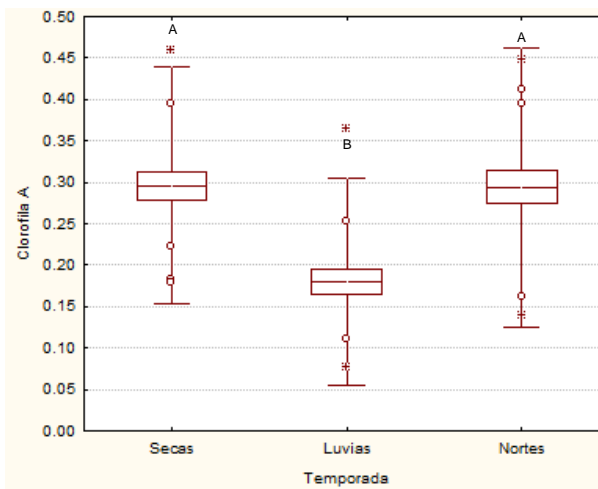


Figura 31. Clorofila a mg/g

En cuanto a la distribución espacial (Figura 32), se observó una menor cantidad de clorofilas en el mes de junio, correspondiente a la temporada de lluvias (34B) donde el valor promedio fue de 0.18 mg/g con niveles mínimos de 0.08 y máximos de 0.36 mg/g reportándose el valor mínimo en el sitio A2 el cual es el sitio de muestreo más cercano a la ciudad de Campeche; el valor máximo se registró en el sitio F2 uno de los sitios más alejados de la costa y la ciudad para la misma temporada. El promedio de la clorofila a aumenta en la época de nortes (0.29 mg/g) de manera similar al de secas (0.30 mg/g), con la diferencia de que las concentraciones de clorofila b son muy similares a los valores registrados en éste estudio para clorofila b, por lo que la relación muestra resultados anómalos lo cual se puede relacionar con alguna situación de estrés. Destaca la estación A2 en secas y lluvias, debido a que los resultados registraron valores anómalos frente a la costa de la ciudad de

Campeche en donde los niveles de clorofila fueron muy bajos, por lo que se recomienda tener un monitoreo sobre el mismo, ya que es probable que dicho efecto se deba a la cercanía de las actividades antropogénicas (descargas de aguas residuales y otros contaminantes de la ciudad).

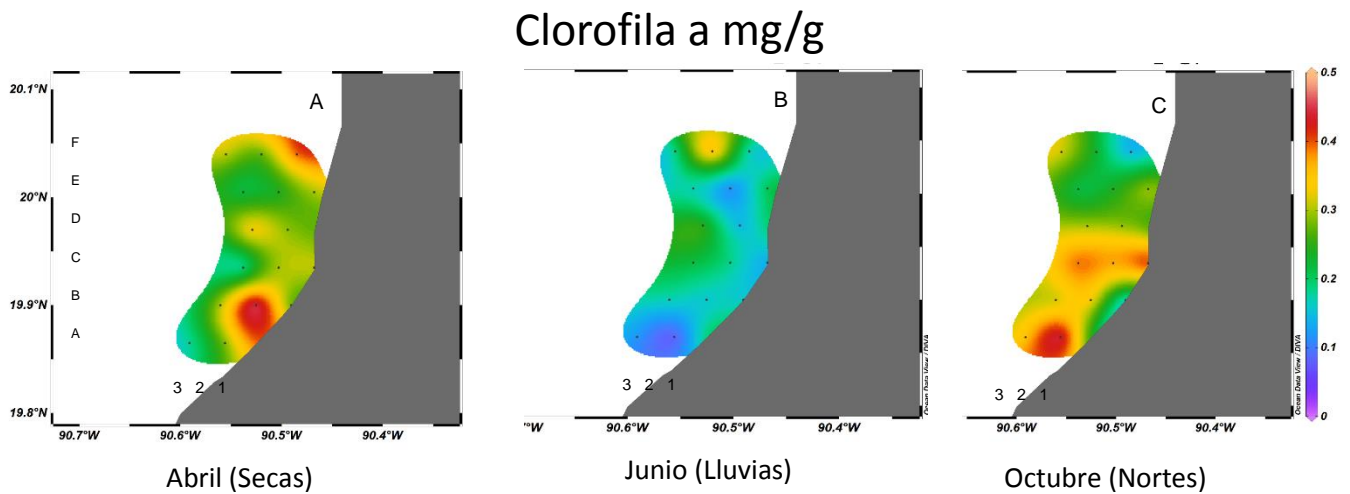


Figura 32. Concentraciones de clorofila a en la RBLP

Clorofila b

En la Figura 33 se muestra la variación estacional de las concentraciones de clorofila b, las cuales tuvieron un comportamiento similar al de la clorofila a. Específicamente, la temporada de lluvias presentó valores promedio significativamente menores a los registrados en la temporada de nortes y secas (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F= 24.1$). Así mismo, se puede observar que los niveles de clorofila b aumentan en el periodo de nortes con una media de 0.25 mg/g y un máximo de 0.35 mg/g.

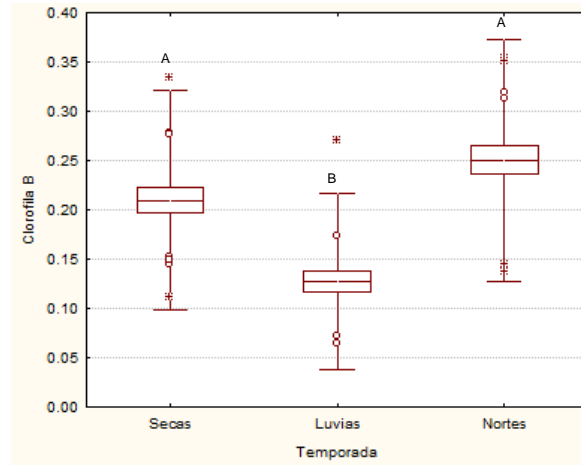


Figura 33. Concentraciones de clorofila b mg/g

La clorofila b trabaja en un rango de absorción de luz distinto al de la clorofila a, es decir absorbe la luz no visible de color azul, para completar el espectro de absorción visible de la clorofila a. En la Figura 34 se puede observar que al igual que la clorofila a, la clorofila b presentó una menor concentración en el mes de junio, correspondiente a la temporada de lluvia (34 B) con un promedio 0.13 mg/g y un valor mínimo de 0.06 mg/g correspondiente al sitio A2. El promedio más alto (0.25 mg/g) se presentó en la temporada de nortes (Figura 34C) (0.25 mg/g) mostrando su nivel máximo en el sitio C1 (0.35 mg/g) y su nivel mínimo en el sitio B1 (0.14 mg/g).

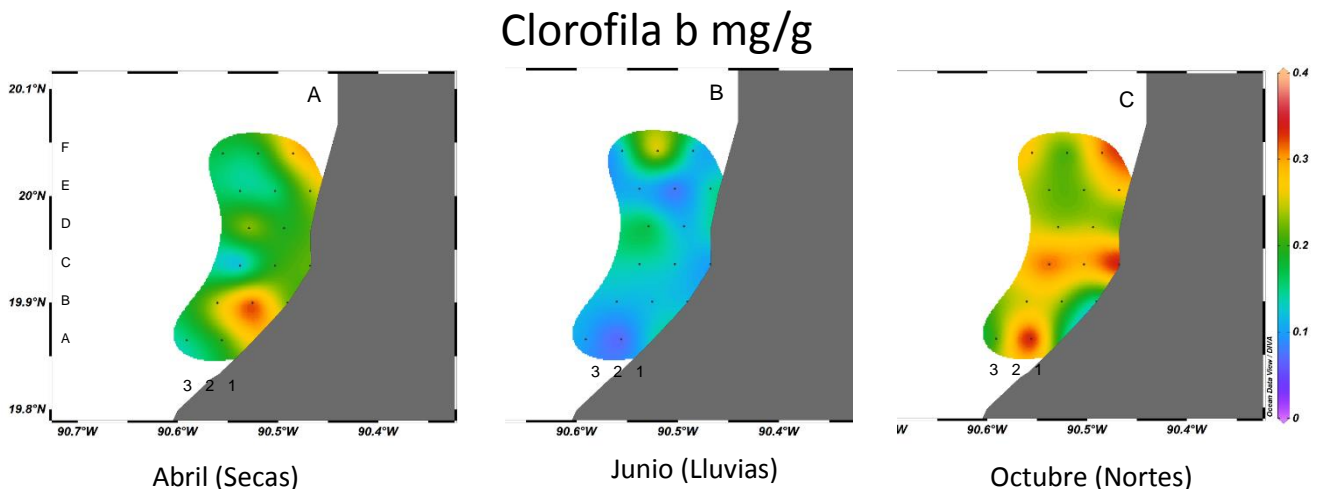


Figura 34. Isolíneas de clorofila tipo b

Clorofilas totales

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de clorofilas totales, siendo el periodo de lluvias (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F= 19.5$) el que presentó los valores más bajos (Figura 35).

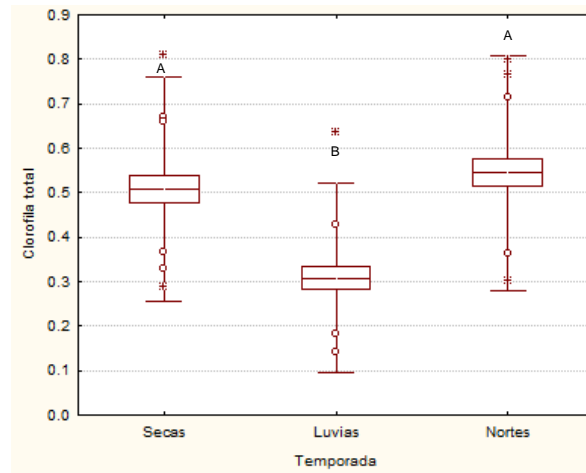


Figura 35. Clorofila total (mg/g)

Las concentraciones de clorofilas totales presentaron un promedio de 0.32 mg/g en la temporada de lluvias con un valor mínimo de 0.14 mg/g en el sitio A2 cercano a la ciudad de Campeche; en contraste, las temporadas de nortes y secas fueron similares con promedios de 0.55 y 0.51 mg/g respectivamente. En la distribución espacial de este parámetro se pudo observar el valor más alto en el sitio B2 en la temporada de secas (Figura 36 A) 0.81 mg/g. Éstos resultados son similares a los presentados por Cabello (2004), en el presente trabajo los niveles más altos se obtuvieron en la temporada de nortes (Figura 36 C) lo cual podría deberse a una posible estimulación causada por la temporalidad, ya que al incrementar el movimiento de la superficie en esta, temporada disminuye la penetración de luz al y al aumentar la turbidez del agua, esto provoca que los pastos produzcan mayor cantidad de clorofilas con la finalidad aprovechar la poca disponibilidad de luz; así la baja eficiencia fotosintética produce una respuesta compensatoria en la que se incrementan las concentraciones de clorofila (Lee y Dunton, 1997). Se recomienda

realizar un monitoreo sobre aquellos sitios que mostraron niveles bajos reiteradamente, ya que pueden evidenciar alguna situación de estrés.

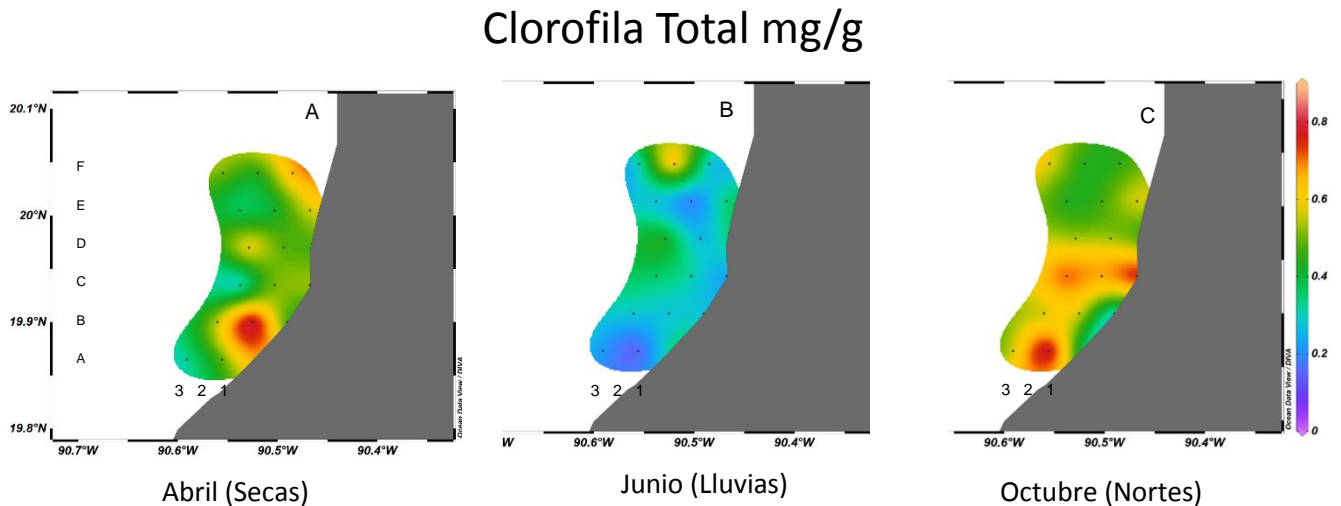


Figura 36. Isolíneas de clorofilas totales

Relación de clorofilas a/b

En la Figura 37 se presentan los valores de la relación clorofila a/clorofila b (Chl a/b), los cuales muestran diferencias significativas en la época de lluvias según la prueba estadística Kruskal-Wallis ($H= 3, 132, 155, p < 0.05$). El rango típico para la adaptación genética depende de la relación Chl a/b, y por consiguiente la clasificación que se le dará a la planta (sol o sombra); para plantas de sombra los valores son 1.6–2.2 mg/mol y, para plantas de sol, es de aproximadamente 2.2-3.4 mg/mol (Celdran, 2017), encontrando en el presente estudio los niveles más altos en las temporadas de secas con 2.06 ± 0.19 mg/mol y un promedio de 1.47 mg/mol, mientras que las temporadas de lluvias y nortes muestran niveles bajos con promedios de 0.95 ± 0.48 mg/mol y 1.13 ± 0.09 mg/mol, respectivamente, por lo que los pastos marinos presentan resultados similares a las plantas de sombra y, por lo consiguiente, su plasticidad fisiológica es menor.

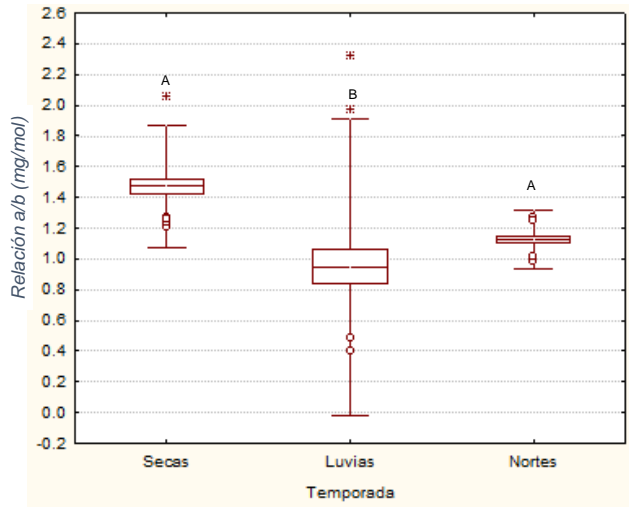


Figura 37. Relación de Clorofilas a/b (mg/mol)

En la Figura 38 se muestran que los niveles más bajos para las temporadas de lluvias y nortes (0.95 ± 0.48 mg/ mol y 1.13 ± 0.09 mg/mol), por lo que en estas temporadas la plasticidad fisiológica es menor, es decir, las praderas de pastos marinos presentan una mayor vulnerabilidad ante eventos estresores.

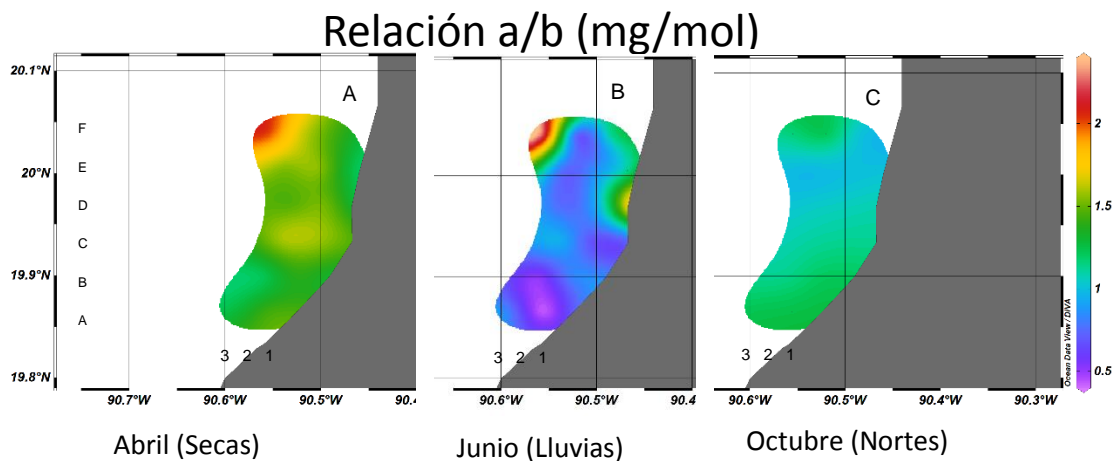


Figura 38. Isolíneas de clorofila a/b

Proteínas

En la Figura 43 se muestran las concentraciones de proteínas, trabajos previos relacionan la disminución de proteínas en las hojas de *Thalassia testudinum* con el daño fotosintético (Murata *et al.* 2006). En el presente estudio se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los muestreos (ANOVA; $\alpha=0.05, p < 0.05, F= 184.02$) (Figura 39). La concentración más alta de proteínas se registró en la temporada de nortes con un promedio de 28 mg/ml, presentando su nivel máximo en el sitio F1 (32.63 mg/ml), mientras que sus niveles más bajos se registraron en los sitios A y B. El promedio de proteínas más bajo (9.36 mg/ml) se registró en el periodo de lluvias (Figura 40B) y en el periodo de secas se registró un promedio de 23.55 mg/ml donde el nivel máximo fue en el sitio C1 (30.38 mg/ml) y en mínimo en el B2 (18.83 mg/ml).

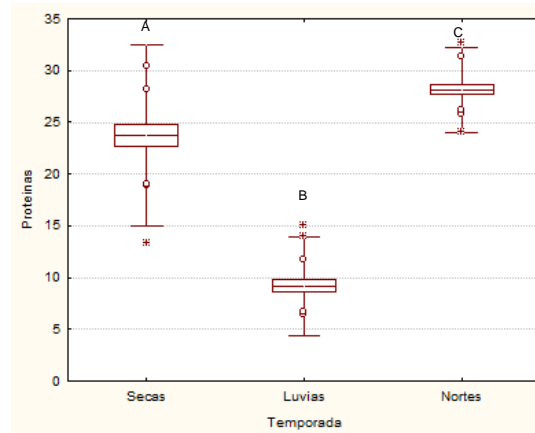


Figura 39. Proteínas (mg/g)

De acuerdo con Nishiyama *et al.* (2006), los organismos fotosintéticos han desarrollado un proceso de reparación para evitar la acumulación del daño fotosintético que consiste en la síntesis de proteínas, además, se ha encontrado que los niveles altos de especies reactivas de oxígeno suprimen la síntesis de casi todas las proteínas teniendo como consecuencia la inhibición de la reparación del daño fotosintético, como se puede observar en la temporada de lluvias donde los niveles de proteínas son bajos (Figura 40B).

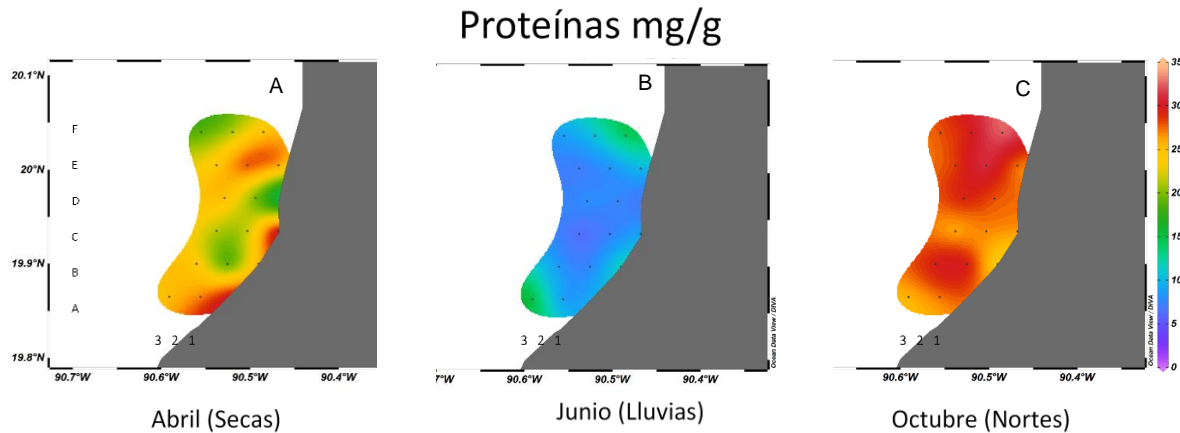


Figura 40. Isolíneas de proteínas mg/g

Lipoperoxidación

La peroxidación lipídica se produce en la formación y propagación de radicales de lípidos, la absorción de oxígeno, un reordenamiento de los dobles enlaces insaturados en los lípidos, y la eventual destrucción de los lípidos de membrana, produciendo una variedad de productos de degradación, incluyendo alcoholes, cetonas aldehídos, y éteres (Buegue, 1978). Se puede observar que la mayor cantidad de estrés oxidativo se presentó en el temporada de lluvias (Figura 42B) con un promedio de 0.74 MDA nmol/mg proteína, el nivel más alto se registró en C3 y D1 con valores de 0.9 MDA nmol/mg proteína, mostrando que, en la temporada de lluvias es muy probable que los pastos se encuentren bajo una situación de estrés.

Los niveles más bajos de estrés oxidativo se registraron en la temporada de secas (Figura 42C) con un promedio de 0.37 MDA nmol/mg proteína, mientras que, los niveles más altos se registraron en los sitios B1 y A, mostrando de esta forma que debido a la cercanía que se tiene con la ciudad es posible que ahí se estén llevando a cabo actividades antropogénicas contaminantes que estén causando estrés oxidativo sobre el pasto marino.

En la Figura 41 se muestran los valores de lipoperoxidación donde se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los muestreos (ANOVA; $\alpha=0.05$, $p < 0.05$, $F = 53.4$)

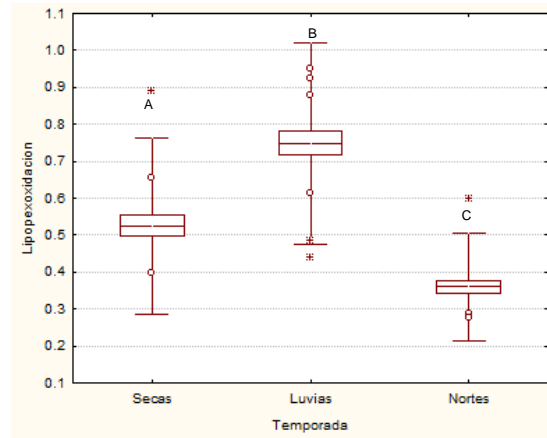


Figura 41. Concentraciones de lipoperoxidación (MDAnmol/mg proteína)

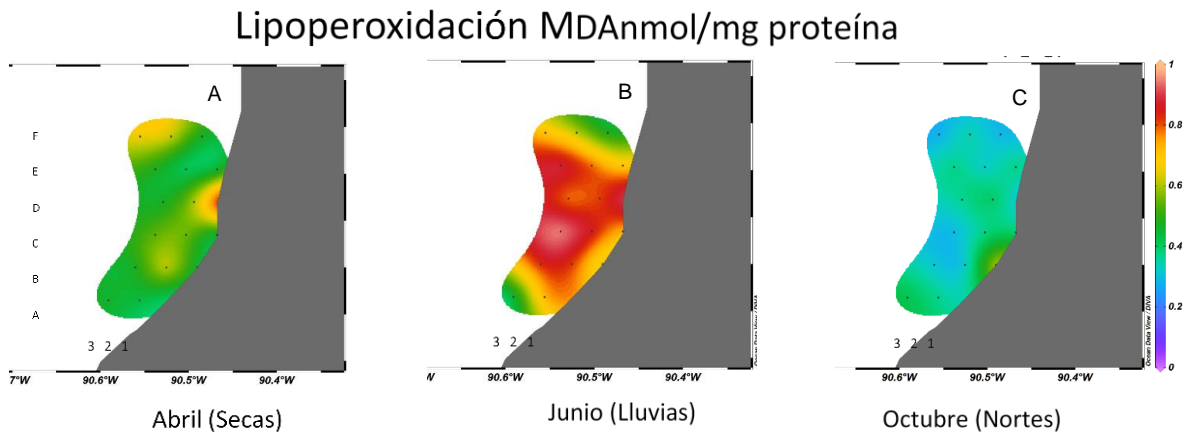


Figura 42. Isolíneas de lipoperoxidación MDAnmol/mg proteína

La evaluación de los diferentes biomarcadores en los pastos marinos de la RBLP durante un ciclo anual, representan el primer reporte de estos indicadores de estrés y conforman una primera línea base para este ecosistema. La importancia de estos resultados radica en la posibilidad de que sean usados para evaluar los efectos de otros factores de estrés como pudiera ser la presencia de hidrocarburos resultado de un derrame accidental, lo cual es probable ya que la RBLP se encuentra cerca

de la Sonda de Campeche, donde como ya se ha mencionado se producen y transportan cantidades importantes de hidrocarburos.

Azúcares

En la Figura 43 se muestra la variación estacional de las concentraciones de azúcares, se puede observar que los niveles de la temporada de nortes muestran diferencias estadísticamente significativas con secas y lluvias, de acuerdo con la prueba estadística Kruskal-Wallis ($H= 286,468$, $p < 0.05$). Así, el periodo de nortes representa mayor estrés en cuanto a este marcador, ya que los azúcares son importantes para la resistencia de los pastos marinos ante factores de estrés, lo cual podría indicar, además que existe una baja asimilación de CO_2 y, por lo tanto una ausencia de azúcares, por lo que se recomienda analizar la concentración de azúcares en la raíz.

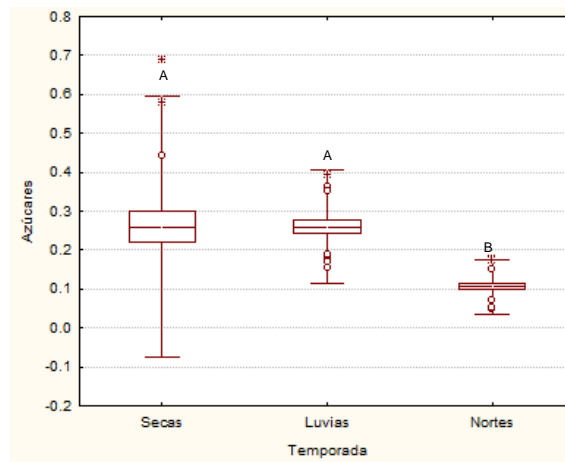


Figura 43. Azúcares totales mg/g

Los azúcares son importantes en la resistencia de las plantas ante eventos de estrés, al servir como un "mecanismo de rescate", los pastos marinos asignan una parte sustancial de su biomasa bajo el suelo de órganos de almacenamiento (rizomas), estas estructuras sirven como reserva para apoyar el crecimiento de la planta y el mantenimiento durante períodos de baja capacidad fotosintética.

Se puede observar que durante la época de lluvias se registró el promedio más alto de concentración de azúcares en las muestras de hojas del pasto marino *Tt.* (0.27 mg/g), aunque en la temporada de secas donde se presenta un promedio (0.26 mg/g), la importancia de este es que sobresalen algunos sitios más altos (Figura 44 A) dichos sitios A1, A2 y A3 obtuvieron resultados de 0.69, 0.44 y 0.58 mg/g, respectivamente, siendo estas zonas cercanas a la ciudad, de igual forma en la

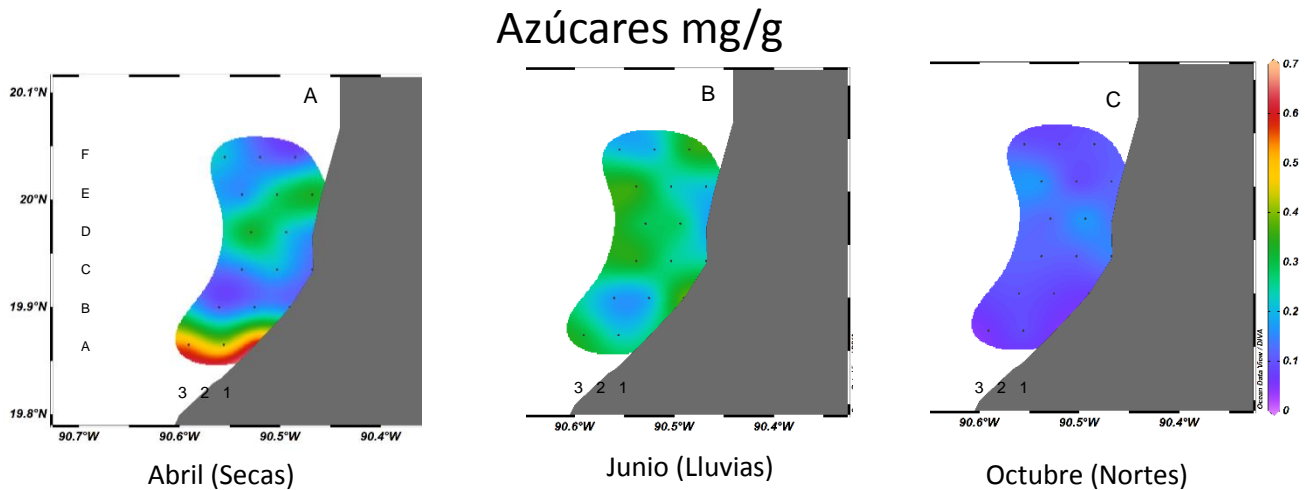


Figura 44. Isolíneas de azúcares mg/g

época de lluvias se muestran con mayor concentración los sitios cercanos a la ciudad de Campeche y la costa, lo cual se puede relacionar con la poca penetración de luz para llevar a cabo la fotosíntesis, los niveles más bajos se encuentran en la temporada de nortes (30 mg/g) con lo que se puede inferir que los niveles de estrés son bajos, aunque existe la posibilidad que, debido a la deficiencia de CO₂ no se logren metabolizar azúcares de forma adecuada. Los sitios A y B en la temporada de secas y lluvias coinciden presentando niveles altos de azúcares, por lo que se recomienda realizar monitoreos para identificar las posibles fuentes antropogénicas que provocan esta respuesta de estrés en los pastos.

Fenoles

Las concentraciones de fenoles muestran un comportamiento parecido al de los azúcares; en la Figura 45 se pueden observar concentraciones menores estadísticamente significativas entre la temporada de nortes comparado con las

temporadas secas y lluvias, de acuerdo con la prueba estadística Kruskal-Wallis ($H=1,749, 237, p < 0.05$).

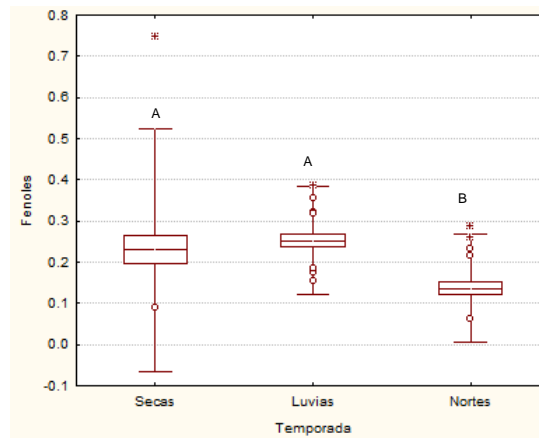


Figura 45. Concentración de fenoles (mg/g)

Los fenoles son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica y sirven como mecanismo de defensa, por lo que se producen ante una situación de estrés (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). El sitio D1 en secas presentó el valor más elevado con 0.75 mg/g, sin embargo se pueden observar valores anómalos distribuidos el periodo de lluvias (Figura 46B) que aunque tienen un promedio de 0.25 mg/g presenta algunos valores anómalos en los sitios cercanos a la ciudad de Campeche (Figura 46 A y B) resaltan algunos sitios cercanos a la ciudad de Campeche y de la misma forma el sitio E, lo cual puede significar que están respondiendo a alguna situación de estrés.

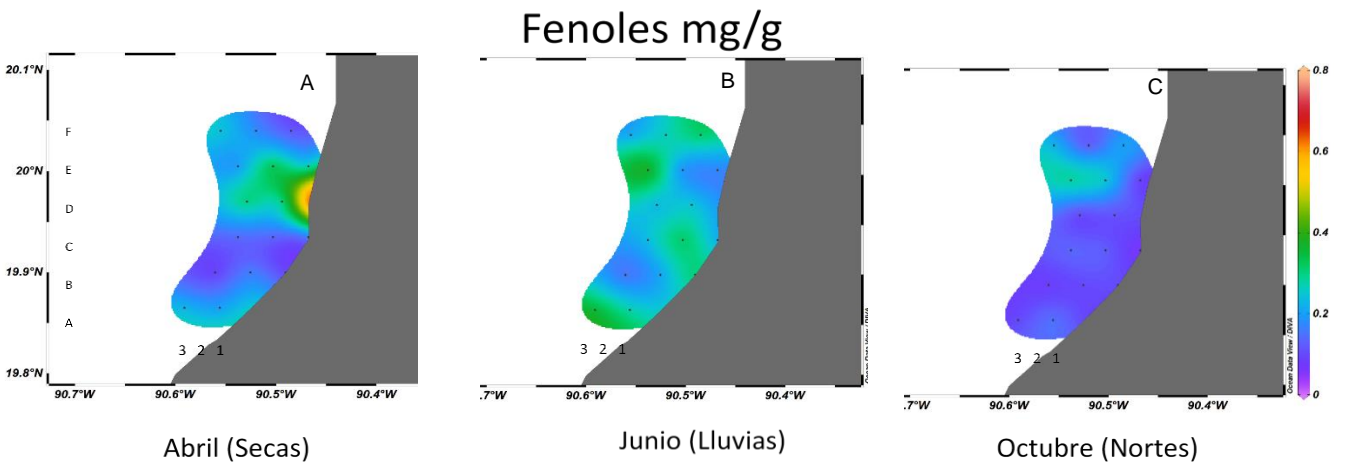


Figura 46. Fenoles mg/g

9.4 Pruebas de Correlación entre Biomarcadores y factores ambientales

La tabla 3 muestra las correlaciones encontradas entre los parámetros fisicoquímicos y los biomarcadores, donde se observan las relaciones entre clorofilas, proteínas ($r=0.61$) y lipoperoxidación ($r=0.62$), lo cual puede ser un indicador que, en presencia de especies reactivas al oxígeno, existirá deficiencia en los sistemas fotosintéticos y en la síntesis de proteínas (Aránguiz *et al.* 2009).

En los parámetros fisicoquímicos se observa como el pH tiene correlación con los biomarcadores clorofilas a y b ($r=0.64$) y proteínas ($r=0.76$), y de manera inversa con lipoperoxidación ($r=-.061$), por lo que los cambios en este parámetro podrían influir sobre dichos biomarcadores.

Se encontró correlación inversa con las concentraciones reportadas en lipoperoxidación contra clorofila B ($r=-0.62$) y proteínas ($r= -0.92$), y para los parámetros fisicoquímicos, salinidad ($r= 0.66$)

Tabla 3. Correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y los biomarcadores.

	Clorofila_a	Clorofila b	Clorofila total	Relación a/b	Azúcares	Fenoles	Proteínas	Lipoperoxidación
Clorofila_a	1.0	0.86	0.97	-0.15	-0.18	-0.28	0.52	-0.46
Clorofila b	0.86	1.0	0.95	-0.46	-0.28	-0.28	0.67	-0.62
Clorofila total	0.97	0.95	1.0	-0.29	-0.22	-0.28	0.61	-0.55
Relación a/b	-0.15	-0.46	-0.29	1.0	0.33	0.23	0.50	0.52
Azúcares	-0.18	-0.28	-0.22	0.33	1.0	0.42	-0.25	0.25
Fenoles	-0.28	-0.28	-0.28	0.24	0.42	1.0	-0.40	0.43
Proteínas	0.52	0.67	0.61	-0.50	-0.25	-0.40	1.0	-0.92
Lipo	-0.46	-0.62	-0.55	0.52	0.25	0.44	-0.92	1.0
Temp(°C)	0.17	0.18	0.18	0.19	0.22	0.29	0.14	-0.04
Salinidad (uups)	-0.28	-0.51	-0.39	0.67	0.48	0.48	-0.65	0.66
O2 (mgL-1)	-0.06	-0.27	-0.15	0.45	0.13	0.38	-0.49	0.59
pH	0.64	0.64	0.66	-0.32	-0.19	-0.32	0.76	-0.61
Potencial REDOX_(mV)	-0.23	-0.24	-0.24	0.02	0.06	0.35	-0.40	0.37

10.RESULTADOS DE ANÁLISIS MULTIVARIADO NO PRAMETRICOS

11.RESULTADOS BIOMARCADORES

La Figura 47 muestra el análisis de componentes principales (ACP) de los biomarcadores tomados en cada sitio de colecta durante 3 estaciones climáticas. El símbolo de colores indica la temporalidad de los datos: triángulo verde (temporada de secas), triángulo invertido azul (temporada lluvias) y cuadrado azul turquesa (temporada nortes). Los números asociados a cada símbolo en el ACP corresponden al transecto del cual se obtuvieron las muestras, siendo secas el transecto más pegado a la costa, lluvias el transecto medio y nortes el transecto más alejado de la costa.

ACP

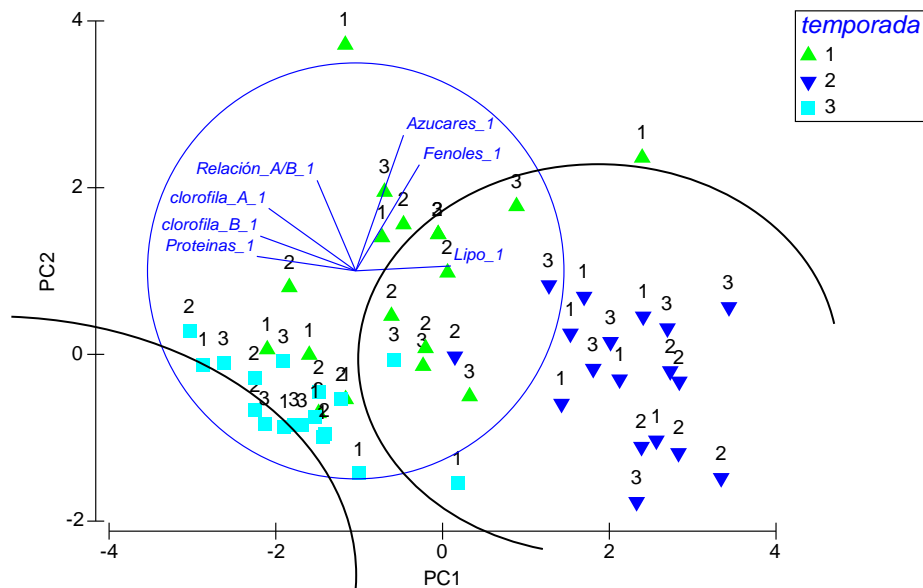


Figura 47. Análisis de Componentes principales

Tabla 4. Componentes principales

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
clorofila_a_1	-0.418	-0.301	0.123	-0.509	0.253
clorofila_b_1	-0.458	-0.167	0.320	-0.348	0.009
Relación_a/b_1	-0.185	-0.435	-0.854	-0.028	-0.123
Azúcares_1	0.229	-0.652	0.202	0.406	0.554
Fenoles_1	0.306	-0.511	0.292	-0.115	-0.731
Proteinas_1	-0.475	-0.070	0.051	0.426	-0.227
Lipo_1	0.457	-0.024	-0.156	-0.510	0.166

Nota: CP componente principales

El resultado indica que la descomposición de la variabilidad de los resultados en 2 componentes principales aporta el 66.1% de la variación de la cual el primer componente aporta el 49.9% y el segundo el 16.2%. Las variables que más aportaron al primer componente son las proteínas ($r=0.475$), la clorofila b (0.458) y lipoperoxidación (0.457); Para el componente 2 los azúcares y fenoles tuvieron la mayor correlación (0.652 y 0.511 respectivamente).

La Figura 48 del ACP muestra claramente que la estructura de los datos se separa de acuerdo al componente 1, siendo las variables proteínas, clorofila b y lipoperoxidación los parámetros que más influyeron en esta estructura.

La temporada que registró promedios más altos en proteínas fue la de nortes, el mismo comportamiento se presenta para clorofila b mientras que, para lipoperoxidación, la concentración más alta fue en lluvias.

El componente 2 (azúcares y fenoles) tiene influencia en la separación de la temporada de secas respecto a las otras dos (lluvias y nortes), las cuales deben ser muy parecidas en los valores promedio de los datos que tienen más influencia en fenoles y azúcares.

10.2 Resultados variables ambientales

Se hizo un matriz de correlación entre las variables y se encontró que varias covariaban por lo que éstas se descartaron para el análisis posterior. Resultando 5 variables ambientales.

En la Figura 48 se presenta el análisis de componentes principales de las variables ambientales tomadas en cada sitio de colecta durante 3 estaciones climáticas. 1= Secas, 2=Lluvias y 3=Nortes.

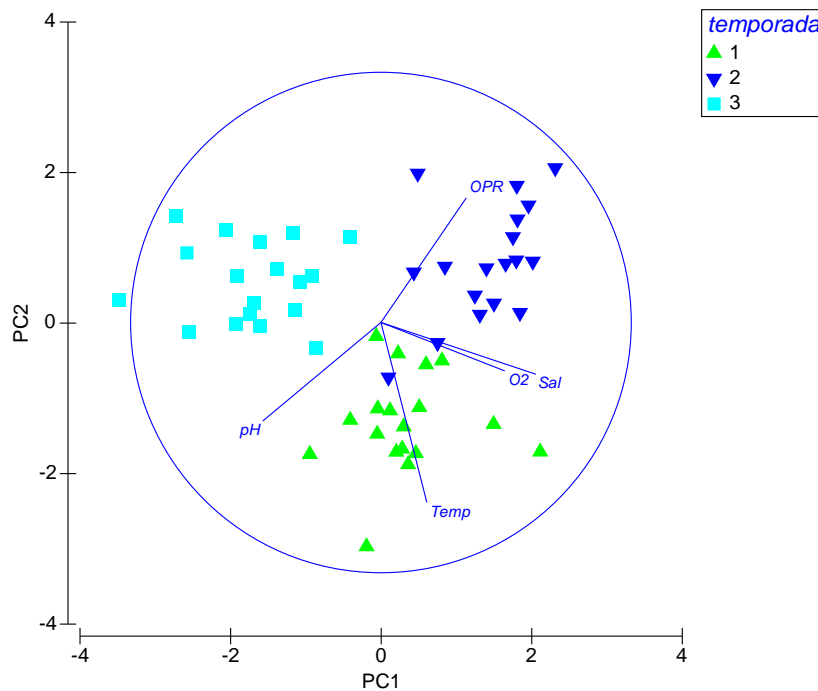


Figura 48. Análisis de componentes principales, parámetros fisicoquímicos

Tabla 5. Componentes principales de las variables ambientales

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Temp	0.183	-0.719	0.313	-0.470	0.361
Sal	0.619	-0.207	0.167	0.107	-0.731
O2	0.494	-0.193	-0.721	0.276	0.349
pH	-0.472	-0.394	-0.560	-0.309	-0.462
OPR	0.341	0.498	-0.202	-0.772	-0.012

Nota: CP componente principal

El 69% de la contribución está dado por los dos primeros componentes principales que explican el 43% y 26.8% de la variabilidad de los datos.

CP1: la salinidad (0.619), oxígeno (.494) y pH (.472) fueron las variables que más se relacionaron mientras que, para el CP2: la temperatura fue la que tuvo más influencia (0.719).

De acuerdo a la Figura 48 las estaciones de muestreo se agrupan de acuerdo a la estación climática, es decir: las temporadas 1, 2 y 3 y se separan principalmente por la salinidad y la temperatura, las cuales varían en las diferentes temporadas.

Para encontrar si ambas distribuciones espaciales de la variabilidad de los datos de los biomarcadores tenían relación con los datos ambientales se hizo una correlación de matrices de disimilitudes euclidianas (RELATE; Testing matched resemblance matrices). EL resultado de este análisis indicó que la matriz de datos ambientales explica la estructura de los biomarcadores con un nivel de significancia de 0.01% y $p= 0.378$.

En las gráficas de la Figura 49 se puede observar cómo cambian los valores de salinidad, pH y temperatura en cada estación. La diferenciación por estación se ve en la Figura 49A donde se separan en 3 grupos los valores de los biomarcadores de acuerdo a las estaciones climáticas y, en las siguientes graficas se observa el cambio de las variables salinidad, pH y temperatura.

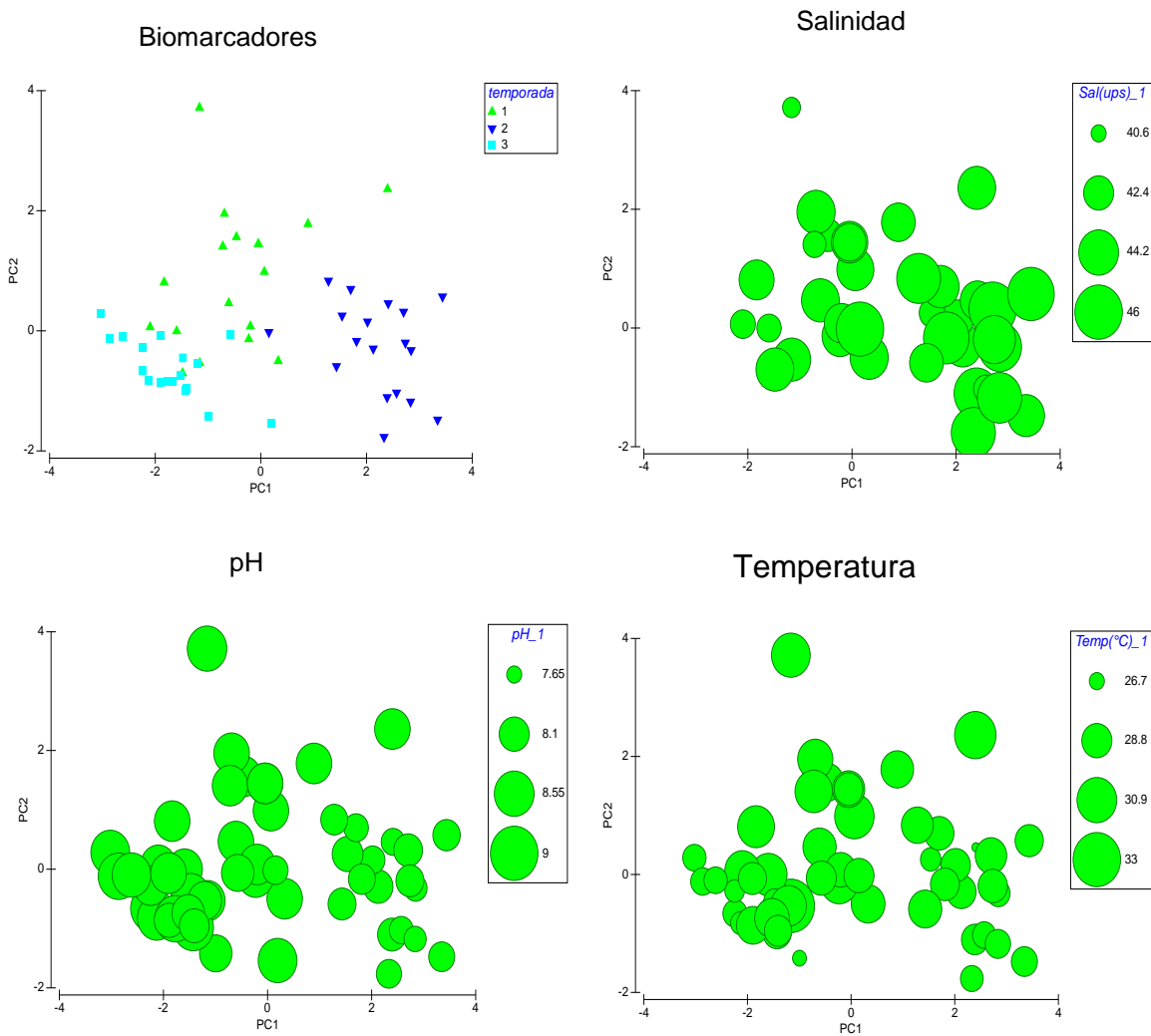


Figura 49. Comparación visual de la distribución de los biomarcadores, sobreponiendo los valores de cada uno de las variables ambientales.

Los niveles más bajos de temperatura y oxígeno disuelto se presentaron en nortes con 27.9 ± 1.1 mientras que, la variable salinidad presentó el mismo comportamiento. La temporada donde se presentaron los niveles más bajos de pH fue en lluvias.

12. CONCLUSIONES

- Los biomarcadores mostraron que la temporada de lluvias representa el mayor estrés para los pastos marinos *Thalassia testudinum*, lo cual, en parte, es resultado del aumento en los sólidos disueltos que provocan una disminución de la penetración de la luz en la columna de agua, lo que disminuye la eficiencia fotosintética.
- Los menores niveles de estrés en los pastos marinos se presentan en la época de secas, donde las concentraciones de fenoles y azúcares son bajas con excepción de los sitios cercanos a la ciudad de Campeche.
- Los sitios cercanos a la ciudad de Campeche muestran con frecuencia que los pastos marinos se encuentran bajo la influencia de algún factor de estrés adicional, por lo que se recomienda un monitoreo más intensivo en éstas áreas y la identificación de las fuentes de contaminantes.
- En lluvias y nortes se arrastran contaminantes hacia la zona costera, esto puede ser demostrado por los altos niveles de lipoperoxidación detectados, ya que el metabolismo de dichos contaminantes produce especies reactivas de oxígeno que ocasionan la oxidación de las biomoléculas de los pastos marinos.
- Los valores de los biomarcadores medidos en este estudio, conforman una línea base que podrá ser de utilidad para evaluar otros factores de estrés como la presencia de hidrocarburos, lo cual es probable en esta zona ya que la Reserva de Biosfera los Petenes se encuentra ubicada cerca de la Sonda de Campeche, donde actualmente se extrae petróleo y pudiera ocurrir un derrame accidental de estos contaminantes.
- El pasto marino *T. testudinum* es un buen indicador de situaciones adversas ya que, a través de la evaluación de algunos biomarcadores se pudieron identificar situaciones de estrés como la época de lluvias y la influencia de la Ciudad de Campeche.

13. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con las mediciones de las condiciones ambientales en las que se encuentran los pastos marinos (temperatura, salinidad, oxígeno disueltos potencial de Hidrogeno y potencial redox) con el fin de conocer la dinámica del sitio y su comportamiento en un periodo más extenso que el anual.
- Cuantificar nutrientes y contaminantes con el fin de conocer las concentraciones que existen en el medio y realizar correlaciones con los biomarcadores.
- Desarrollar bioensayos con Fracción Soluble de Petróleo, con el fin de conocer las respuestas de los biomarcadores a concentraciones conocidas.
- Medir otros biomarcadores como carotenoides, flavonoides, catalasa, para complementar esta información.
- Además de los biomarcadores mencionados que se evalúan en hojas, cuantificar carbohidratos en rizomas.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Legorreta. T., Mendoza-Cozatl, D., Moreno-Sanchez, R. y Gold-Bouchot G. (2008). Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 86; 12-19.

Aránguiz, F., Gaete, H., Hidalgo, M. E. y Lobos, G. (2009). Daño oxidativo en la microalga *pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en del Río Blanco (V Región, Chile). *Química Nova*, 32 (9), 2417-2422.

Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 2, 1–15.

Atwood, K. D., Burton, J. F., Corredor, E.J., Harvey, R.G., Mata, J.A., Botello A.V. y Wade A. B., (1988). Petroleum pollution in the Caribbean. *Oceanus*, 30 (4), 25-32.

Avalos, G. A. y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145.

Barrios R., Contreras F. y Correa, J. (1992). *Estudio ecológico y protección de aves acuáticas en los humedales de la Laguna de Términos y Los Petenes Estado de Campeche*. Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología Delegación, pp. 9 Campeche México.

Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R. N., Rebolledo-Vieyra, M. y Merediz-Alonso G. (2011). The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 19; 507–524.

Bianchi T. S. y Canuel E. A. (2011). *Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems*, Princeton University Press, pp. 79-80, United States of America.

Borum, J., Sand-Jensen, K., Binzer, T., Pedersen, O. y Greve, T. M. (2006) *Oxygen Movement in Seagrasses. Seagrasses: biology, ecology and conservation*, pp. 255-270, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Botello, A. V. (2005). *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias 2da Edición: Características Composición y Propiedades Físicoquímicas del Petróleo*, pp. 262-265, Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, Mexico.

Botello, A. V., Ponce-Velez G, Castro, Toledo, A., Diaz-Gonzalez, G. y Villanueva, S. (1992). Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo*, 8 (102), 28-48.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*, 72, 248-254.

Buege, J. A. y Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 53, 302-310.

Cabello-Pasini, A., Muñiz-Salazar, R. y Ward, D. (2004). Caracterización bioquímica del pasto *Zostera marina* en el límite sur de su distribución en el Pacífico. *Ciencias Marinas*, 30, 21-34.

Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A. y Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique*, 61, 191–202.

Campbell, J. E., Yarbrow, L. A. y Fourqurean, J. W. (2012). Negative relationships between the nutrient and carbohydrate content of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*, 99, 56-60.

Celdran, D. (2017). Photosynthetic activity detected in the seed epidermis of *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*, 136, 39-42.

Chapin, F.S., Ernst-Detlef, S. y Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 21, 423-447.

Chavez, N., Escudero, J. C. y Gutierrez-Merino, C. (1997). Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *Chemical Ecology*, 23 (3), 579–603.

Chérif, M, Nodet, P. y Hagège, D. (1996). Malondialdehyde cannot be related to lipoperoxidation in habituated sugarbeet plant cells. *Phytochemistry*, 41 (6) 1523-1526.

CONABIO. (2006). *Ficha técnica para la evaluación de los sitios prioritarios para la conservación de los ambientes costeros y oceánicos de México*. Golfo de México: CONANP.

CONABIO. (2012). *Evaluación y monitoreo de manglar en la Reserva de la Biosfera Los Petenes con énfasis en criterios de sustentabilidad y desarrollo*. Campeche: CONABIO.

CONAGUA. (2016). *Ley Federal de Derechos. Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales*. México, D. F., México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

CONANP. (2003). *Ficha Informativa de los Humedales Ramsar*. Península de Yucatán: PRONATURA.

CONANP-SEMARNAT. (2006). *Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Petenes*. México: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Contaminación e Impacto Ambiental 2da Edición (pp. 261-268). México: Instituto Nacional de Ecología.

Daranas, B. R. (2007). Características y estado de conservación de los pastos marinos en áreas de interés del Archipiélago Sabana-Camaguey. Tesis (Doctorado en Ciencias Biológicas). Habana, Cuba, Universidad de la Habana, Facultad de Biología.

den Hartog, C. y Kuo, J. (2006). Taxonomy and biogeography of seagrasses. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, pp 1-23, Springer, Netherlands.

Duarte, C. M., Middelburg J. J. y Caraco, N. (2005). Major role of marine vegetation on the oceanic carbon cycle. *Biogeosciences*, 2, 1-8.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers P. A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350–356.

Echarri, L. (1998). *Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente*, pp 200. Ed. Teide, Madrid.

Enriquez, S, Marbá, N., Duarte, C. M., van Tussenbroek, B. I. y Reyes-Zavala, G. (2001). Effects of *Thalassia testudinum* on sediment redox. *Marine Ecology Progress*, 2019, 149-158.

Fernández, M. D., Llanio, M., Dajas, F., Echeverri, C., Ferreira M., Hernández, I., Cabrera, B., Rodríguez, M., Valdez, O., Aneiros, A., Abad, M. J. y Bermejo, P. (2004). *Thalassia testudinum*: propiedades anti-inflamatoria-analgésica y antioxidante de su extracto. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica, *Revista Cubana de Farmacia*, 38 (2), 124.

Ferrat, L, Pergent-Martini, C. y Romeó, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, 65, 187-204.

García-Cuellar, J. A., Arreguín-Sánchez, F., Hernández, S. V. y Lluch-Cota, D. B. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29, (6) 311-319.

Herbert, A., Guilhermino, L., da Silva de Assis H. C. y Hansen, P. D. (1995). Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Z Zeitschrift fur Angewandte Zoologye*, 3, 1-15.

IMP. Instituto Mexicano del Petróleo. (2001). Identificación y análisis de los aspectos socioeconómicos que han sufrido cambios con relación al establecimiento y desarrollo de las actividades petroleras en la región. *Instituto Mexicano del Petróleo.*, 83.

Kahn, A. E. y Durako, M. J. (2006). *Thalassia testudinum* seedling responses to changes in salinity and nitrogen levels. *Experimental Marine Biology and Ecology* 335, 1-12

Korhonen, L. K., Macías-Carranza, V., Abdala, R., Figueroa, F. L. y Cabello-Pasini, A. (2012). Efecto de la concentración del sulfuro, pH y anoxia sobre la fotosíntesis y respiración de *Zostera marina*. *Ciencias marinas*, 38(4), 625-633.

Lara-Domínguez, A. L. y Yáñez-Arancibia, A. (1999). Productividad secundaria, utilización del hábitat y estructura trófica. *Ecosistemas de Manglar en América Tropical*. Pp. 153-166 Instituto de Ecología AC México.

Lee, K. S., y Dunton, K. H. (1997). Effect of in situ light reduction on the maintenance, growth and partitioning of carbon resources in *Thalassia testudinum* banks ex König. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 210 (1), 53-73.

López Calderón, J. M., Rodríguez, R. R., Torre, J. y Meling, A. (2013). El pasto marino en el Golfo de California: estado actual y amenazas. *CONABIO. Biodiversitas*, 106, 7-10.

Marbá, N., y Duarte, C. M. (2001). Growth and sediment space occupation by seagrass *Cymodocea nodosa* roots. *Marine Ecology Progress Series*, 224, 291-298.

Mooney, H. A., Fichtner, K., y Schulze, E. D. (1995). Growth, photosynthesis and storage of carbohydrates and nitrogen in *Phaseolus lunatus* in relation to resource availability. *Oecologia*, 104 (1), 17-23.

Moore, K. A., Wetzel, R. L., y Orth, R. J. (1997). Seasonal pulses of turbidity and their relations to eelgrass (*Zostera marina* L.) survival in an estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215 (1), 115-134.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., y Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767 (6), 414-421.

Nellemann, C., Corcoran, E., Duarte, C. M., Valdés, L., De Young, C., Fonseca, L., y Grimsditch, G. (2009). Blue Carbon: a rapid response assessment. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal, 80.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S. I. y Murata N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica*. 1757 (7) 742-749.

Ocampo, A. T. (2005). El Golfo de México: Una Fuente de Energía del Atlántico Tropical. En A. V. Botello, Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental:

Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición (págs. 25-52). El Colegio de Michoacán A.C.: Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología.

Ochoa, D. M. y González J. F. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55,115-126.

Odum, E. P. (1972). *Ecología*. Editorial Interamericana. México pp. 639

Orth, R. J., Tim J. B., Carruthers W. C. Dennison, C. M. Duarte, J. W. Fourqurean, K. L. Heck, Jr. A. R. Hughes, G. A. Kendrick, W. J. Kenworthy S. y Olyarnik (2006). A global crisis for seagrass ecosystems. *BioScience* 56 (12) 987–996.

PEMEX. (2003). Anuario Estadístico 2003-Exploración y Producción. PEMEX 64. Documento electrónico. Revisado: 25 marzo de 2016. Recuperado de: http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/anuario_estadistico/Anuario-Estadistico-2003-2013.pdf

Perez, P. E., G. Ettine, E. Marín, A. Casassa P. N. Silva, J. Raga, C. González, L. Sandoval y D. Medina. (2014). Determinación de Fenoles y Flavonoides totales en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.). *CESID-Frutícola y Apícola*, 31, 60-77.

Perry E., Paytan. A., Pedersen, B. y Velazquez O. G. (2009). Groundwater geochemistry of the Yucatan Peninsula, Mexico: Constraints on stratigraphy and hydrogeology. *Journal of Hydrology*, 367 (1), 27-40.

Puijalon, S., Florencie P. y Gudrun B. (2008). Abiotic stresses increase plant regeneration ability. *Evolutionary Ecology*, 22, 493-506.

Ralph, P.J., Durako M. J., Enríquez S., Collier C. J. y Doblin M. A. (2007). Impact of light limitation on seagrasses. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 350,176-193.

Ramírez, R., Guzmán. M., Barrera E. y Miranda G. (2010). *Manual de Procedimientos de Operación Estándares (MPOE) para la toma de muestras, su análisis ecotoxicológico e histológico dentro del marco del Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación de sustancias tóxicas persistentes (PRONAME)*. UAMI /CCA/SEMARNA

RAMSAR. (2003). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR) México: RAMSAR. Documento electrónico. Revisado: 14 de enero de 2016. Recuperado: http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR_RAMSAR/Veracruz/Sistema_Lagunar_Alvarado/Sistema%20Lagunar%20Alvarado.pdf

Rendón von Osten, J., 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, p. 121-140. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.) Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición (págs. 121-140). Campeche: Univ. Autón. de Campeche. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. de México. 696 p

Rivera, A. E., Alpuche. G. L., Negrete. C. M., Nava J. C., Lemus, P. E. y Arriaga Z. C. (2012). *Programa de Manejo Costero Integrado para el Saneamiento de la Bahía de San Francisco Campeche*. Gobierno del Estado de Campeche. Documento electrónico. Revisado: 23 de noviembre de 2016. Recuperado de: http://epomex.uacam.mx/?modulo_micrositio=paginas&acciones...archivo...

Schlitzer, R. (2015). Ocean Data View. Obtenido de <http://odv.awi.de>

Sepúlveda J. G., Porta D. H. y Rocha S. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología A. C.*, 21 (003), 355-363.

Skyba M. Petijová L., Kosuth J., Koleva P. D. y Ganeva G. T. (2012). Oxidative stress and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. plants subjected to low temperature treatment. *Plant Physiology*, 169 (10), 955-964.

Smith, R. D., Pregnall A. M. y Alberte R. S. (1988). Effects of anaerobiosis on root metabolism of *Zostera marina* (eelgrass): implications for survival in reducing sediments. *Marine Biology* 98 (1), 131-141.

Solarte, M. E., Leonardo M. y Melgarejo L. M. (2005). *Fotosíntesis y Pigmentos Vegetales*. Colombia: Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia, pp. 107-122.

SRNT. Subcommittee on Reproductive and Neurodevelopmental Toxicology. (1989). Biologic Markers in Reproductive Toxicology. En C. o. Markers. Unites States: National Research Council. Documento electrónico revisado: 10 de octubre de 2016. Recuperado de: <http://www.nap.edu/catalog/774.html>

Strack, D. (1997) Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, P. M. Dey, J. B. Harborne (Eds) Academic Press, pp. 387-416.

Swain T. A. y Hills W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestic*. I.-The quantitative analysis of phenolic constituents. *Science of Food and Agriculture*, 10 (1), 63-68.

Terrados, J., Duarte, C. M., Kamp-Nielsen., Agawin, N. S. R., Gacia E., Lacap D. Fortes M. D. y Borum J. (1999). Are seagrass growth and survival constrained by the reducing conditions of the sediment. *Aquatic Botany*, 65 (1-4), 175-197.

Van Tussenbroek, B.I. (1995). *Thalassia testudinum* leaf dynamics in a Mexican Caribbean reef lagoon. *Marine Biology* 122 (1), 33-40.

Van Tussenbroek, B.I., Barba S. M. G., Wong J.G. R., Komelis J. V. y Waycott, M. (2010). *Guía de los pastos marinos tropicales del Atlántico oeste. México*, pp. 15-25, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Vangronsveld, J., Mench, M., Mocquot, B. y Clijsters, H. (1998). Biomarqueurs d'exposition des végétaux terrestres aux polluants par les métaux, in L. Lagadic. (Eds) *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lavoisier Technique et Documentation, pp 165-179. Paris.

Vázquez, V. S., Mejía G. C., Gonzalez M. I., Pérez R. R. y Castro B. T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *ContactoS*. 60, 41-48.

Warwick, R.M. y Clarke K.R. 1995. New 'biodiversity' measures reveal a decrease in taxonomic distinctness with increasing stress. *Marine Ecology Progress Series*. 129, 301-305.

Wiseman, W. J. (1999). Circulation patterns inferred from the movement of detached buoys in the eastern Gulf of Mexico. *Continental Shelf Research*, 883-894.

Zeinalov, Y. (2005), Mechanisms of photosynthetic oxygen evolution and the fundamental hypothesis of photosynthesis. In: *Handbook of Photosynthesis*, 2nd ed. (Pessarakly M., ed.). CRC Press, Taylor and Frances Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-19.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00021

Matrícula: 2151801019

EL PASTO MARINO (*Thalassia testudinum*) COMO BIOINDICADOR EN SITIOS AMBIENTALMENTE SENSIBLES A DERRAMES DE HIDROCARBUROS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 18 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALEJANDRO FEDERICO ALVA MARTINEZ
M. EN C. ALMA DELIA NAVA MONTES
DRA. GUADALUPE BARRERA ESCORCIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE)

DE: ISIDRO ARELLANO LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ISIDRO ARELLANO LOPEZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO FEDERICO ALVA MARTINEZ

VOCAL

M. EN C. ALMA DELIA NAVA MONTES

SECRETARIA

DRA. GUADALUPE BARRERA ESCORCIA